

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Evaluación de la bioactividad de nanopartículas híbridas  
cargadas con ácido alfa lipoico en un modelo *in vitro* de  
esteatohepatitis no alcohólica**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Kevin David Martínez García**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Kevin David Martínez García**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Directora de tesis

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**

**Dr. Alexei Federovish Licea Navarro**

**Dr. Víctor Ruiz Cortés**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Kevin David Martínez García** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

**Evaluación de la bioactividad de nanopartículas híbridas cargadas con ácido alfa lipoico en un modelo *in vitro* de esteatohepatitis no alcohólica**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
**Directora de tesis**

La enfermedad esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASDL) comprende desde la acumulación de lípidos (esteatosis) hasta su forma más severa, la esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH). Esta última se caracteriza por inflamación crónica y fibrosis, culminando en cirrosis y/o hepatocarcinoma. Las células estrelladas hepáticas (HSC) son las principales efectoras de la progresión de la fibrosis durante MASH, transdiferenciándose en miofibroblastos que aumentan la expresión de genes profibróticos. En México, la prevalencia de MASLD supera el 40 % debido al alto índice de obesidad y diabetes, representando un problema de salud nacional. Aunque diversas moléculas tienen efecto antifibrótico, muchas fallan en etapas preclínicas por distintos retos asociados a la entrega del fármaco. Por ello, la nanomedicina ha investigado transportadores eficientes para la entrega de fármacos que podrían incrementar el efecto terapéutico. Por tal motivo, en este trabajo se evaluó el efecto del ácido alfa lipoico (ALA) tanto libre como liberado de nanopartículas (NPs) híbridas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) y L-alfa-fosfatidilcolina de soya (HSPC) en un modelo *in vitro* de HSC humanas provenientes de una persona diagnosticada con MASH (HHSC-N). Las NPs híbridas con ALA y recubiertas con HSPC (NPL-ALA) se sintetizaron mediante nanoprecipitación, tienen un tamaño de  $100 \pm 15$  nm por TEM y son citocompatibles a una concentración de hasta 1 mg/mL. Las NPL 1 mg/mL con 0.1 mg/mL de ALA y ALA 0.1 mg/mL libre fueron incubadas con HHSC-N por 48 h y comparadas con células sin tratamiento. Las NPL-ALA fueron capaces de disminuir la expresión de genes profibróticos: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP1) en un 55, 26 y 38 %, respectivamente. Por otro lado ALA libre no tuvo una modulación TGF $\beta$  y TIMP1, mientras que en PDGFR aumento en un 33 % con respecto al control. Estos resultados muestran el potencial de las NPL-ALA como potencial tratamiento, ya que nuestros hallazgos son importantes al utilizar células provenientes de una persona diagnosticada con MASH, lo que nos acerca más a la aplicación preclínica para el desarrollo de potenciales fármacos.

**Palabras clave: MASH, fibrosis, células estrelladas hepáticas, nanopartículas híbridas, nanomedicina.**

Abstract of the thesis presented by **Kevin David Martínez García** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences.

**Evaluation of the bioactivity of hybrid nanoparticles loaded with alpha lipoic acid *in vitro* model of non-alcoholic steatohepatitis**

Abstract approved by:

---

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**  
Thesis Director

The spectrum of metabolic dysfunction associated with steatotic liver disease (MASLD) encompasses conditions ranging from lipid accumulation (steatosis) to its severest manifestation, metabolic dysfunction associated with steatohepatitis (MASH). The latter is typified by chronic inflammation and fibrosis, culminating in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatic stellate cells (HSC) are the principal drivers of fibrosis progression during MASH, undergoing transdifferentiation into myofibroblasts and upregulating profibrotic gene expression. In Mexico, the prevalence of MASLD exceeds 40 %, mainly attributable to elevated rates of obesity and diabetes, constituting a significant national health concern. Despite the existence of various molecules with antifibrotic properties, many falter at preclinical stages due to challenges associated with drug delivery. Consequently, nanomedicine has explored efficient drug transporters to enhance therapeutic efficacy. Thus, this study sought to evaluate the impact of alpha lipoic acid (ALA), both in its free form and released from hybrid nanoparticles (NPs) composed of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and soybean L-alpha-phosphatidylcholine (HSPC), in an *in vitro* model of human HSCs derived from a patient diagnosed with MASH (HHSC-N). The ALA-loaded hybrid NPs (NPL-ALA) were synthesized via nanoprecipitation, coated with HSPC, exhibited a size of  $100 \pm 15$  nm as determined by TEM, and demonstrated cytocompatibility at concentrations up to 1 mg/mL. HHSC-N cells were treated with 1 mg/mL NPLs containing 0.1 mg/mL ALA and 0.1 mg/mL free ALA or left untreated for 48 hours. Subsequently, the expression of profibrotic genes, including platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1), was assessed. NPL-ALA treatment significantly reduced the expression of PDGFR, TGF $\beta$ , and TIMP1 by 55 %, 26 %, and 38 %, respectively, compared to untreated cells. Conversely, free ALA did not modulate TGF $\beta$  and TIMP1 expression, while PDGFR expression increased by 33 % relative to the control. These findings underscore the potential of NPL-ALA as a promising therapeutic intervention, particularly noteworthy given the utilization of cells derived from individuals diagnosed with MASH, thereby advancing us closer to preclinical application for developing novel pharmaceutical agents.

**Keywords: MASH, fibrosis, hepatic stellate cells, hybrid nanoparticles, nanomedicine.**

## Dedicatoria

**A mi familia,** que ha sido un gran pilar en mi vida y apoyo durante este camino.

**A mis amigos,** por estar ahí cuando el camino parecía difícil y darme la mano cada vez que caía.

**A mí,** por siempre decirme: una vez más.

*"Pregúntate hasta dónde quieres llegar  
y responde con acciones a todas esas preguntas"*

K.M

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por permitirme ingresar y utilizar sus instalaciones durante mis estudios de maestría en el posgrado de Ciencias de la Vida.

Este trabajo fue financiado por el proyecto Ciencia de Frontera CONAHCYT CF-2023-I-2458, "Implementación de un modelo 3D de esferoides para la evaluación de potenciales fármacos para la enfermedad por el hígado graso no alcohólico".

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme la beca No. 29365 la cual me permitió llevar a cabo esta investigación y continuar con mis estudios de posgrado.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por sus consejos, enseñanzas y orientación para poder realizar este escrito. Asimismo, por brindarme las herramientas y materiales necesarios para la elaboración del proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis conformado por la Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, Dr. Alexei Federovich Licea Navarro y al Dr. Víctor Ruiz Cortés por sus aportaciones durante el proyecto, así como sus sugerencias para complementar el trabajo. Especialmente a la Dra. Johanna por la capacitación en cultivo celular y apoyo en cualquier duda dentro del laboratorio.

A la Dra. Karla Cervantes Luévano, por su valioso tiempo enseñándome técnicas de biología molecular y resolver mis dudas e inquietudes.

A la Dra Lucia Perezgasca Ciscomani, por enseñarme de electroforesis y por sus consejos dentro del laboratorio.

Al Dr. Rubén Darío Cadena Nava, por sus sugerencias en la síntesis de nanopartículas, su apoyo y disposición con el equipo de DLS.

Al M.C. Juan Pablo Carmona Almazán por su apoyo en la estandarización en la síntesis de nanopartículas. Así como al M.C. David García Topete, por sus recomendaciones en diversos procesos del proyecto.

A mis padres Sonia García y Juan Martínez, por su amor incondicional, confianza y educación a lo largo de mi vida. A mis abuelas Liduvina Sánchez y Elsa Morán, por sus sabias palabras y la alegría que me transmite escucharlas. A mis hermanas, que fueron una motivación para llegar a culminar este trabajo. Y a mi perrita Layka, por ser una avalancha de momentos que provoca tanta alegría a mi vida.

A Oyuki Chacón, por sus palabras de aliento, por su alegría que me brindaba en cada taza de café. Por su conocimiento para convertir la debilidad de mis presentaciones en una fortaleza. Te convertiste en alguien muy especial y no basta un título para ti; solo sé que sin tu apoyo, cada paso habría sido más difícil. En resumen, debo agradecer tu efecto positivo en mi crecimiento académico y personal.

A mis amigos de Ensenada que me proporcionaron su ayuda en el laboratorio: Alcira, Tonantzin, Brenda, Sharlin, y Hugo. Gracias por todas las reuniones, aventuras y consejos que hicieron esta aventura más amena. Especialmente Alcira por todo el apoyo académico y personal, siendo más que una sola mano con la cual sé que puedo contar.

A mi amiga Alondra, por la motivación y compañía que me ha brindado durante este capítulo llamado maestría.



## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas .....	xiv
<b>Capítulo 1.      Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1    Antecedentes .....	2
1.1.1    Enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASDL) .....	2
1.1.2    Esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH) y fibrosis.....	4
1.1.3    Fibrosis y células estrelladas hepáticas (HSC) .....	5
1.1.4    Ácido alfa lipoico .....	7
1.1.5    Nanopartículas híbridas .....	8
1.2    Justificación .....	8
1.3    Hipótesis.....	9
1.4    Objetivos .....	10
1.4.1    Objetivo general .....	10
1.4.2    Objetivos específicos.....	10
<b>Capítulo 2.      Metodología .....</b>	<b>11</b>
2.1    Síntesis de nanopartículas híbridas.....	11
2.2    Caracterización de nanopartículas híbridas .....	12
2.2.1    Diámetro hidrodinámico y potencial Z.....	12

2.2.2	Identificación de grupos funcionales .....	13
2.2.3	Morfología y tamaño.....	13
2.3	Fibroblastos dérmicos humanos .....	13
2.4	Células estrelladas hepáticas humanas de un paciente con MASH.....	13
2.5	Estudios de citocompatibilidad .....	14
2.5.1	Viabilidad celular mediante MTT .....	14
2.5.2	Viabilidad celular mediante azul tripano en HHSC-N.....	15
2.6	Ensayo Indicador del efecto neutralizante de TGF $\beta$ en células HEK-blue TGF $\beta$ .....	15
2.7	Detección de citocinas en HHSC-N.....	16
2.8	Análisis de expresión de genes profibróticos.....	18
2.9	Análisis estadístico .....	20
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>21</b>
3.1	Síntesis de nanopartículas híbridas.....	21
3.2	Caracterización fisicoquímica de nanopartículas híbridas .....	21
3.2.1	Diámetro hidrodinámico y carga superficial .....	21
3.2.2	Identificación del recubrimiento con HSPC mediante FTIR-ATR.....	22
3.2.3	Morfología y tamaño.....	23
3.3	Evaluación del efecto de las nanopartículas en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112sK .....	24
3.3.1	Pruebas preliminares de viabilidad celular mediante MTT.....	24
3.3.2	Evaluación de NPL y NPL-ALA en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$ 1.....	26
3.3.2.1	Evaluación de NPL-ALA en la viabilidad celular mediante MTT .....	26
3.3.2.2	Efecto de la estimulación con TGF $\beta$ en los niveles de expresión de genes profibróticos.....	26
3.3.2.3	Efecto de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos en fibroblastos por 24 h.....	27
3.4	Evaluación de la actividad de TGF $\beta$ en células HEK-Blue TGF $\beta$ .....	28

3.4.1	Efecto de NPL-ALA en la producción de SEAP .....	28
3.5	Evaluación de NPL-ALA en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con MASH (HHSC-N) .....	29
3.5.1	Evaluación de NPL-ALA por MTT en HHSC-N por 24 h .....	29
3.5.2	Evaluación de NPL-ALA por azul de tripano en HHSC-N por 24 h .....	31
3.5.3	Evaluación de citocinas proinflamatorias liberadas de HHSC-N .....	31
3.5.4	Efecto de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos en HHSC-N por 24 h .....	32
3.5.5	Evaluación de NPL-ALA por azul de tripano en HHSC-N por 48 h .....	33
3.5.6	Evaluación de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos por 48 h.....	34
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>36</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
5.1	Perspectivas .....	43
<b>Literatura citada .....</b>		<b>44</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Etiología de NAFLD a MASDL. Adaptado de Bugianesi & Petta, 2022. ....	3
Figura 2. Espectro de la enfermedad esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASDL). La escala NAS mide la progresión de la enfermedad a través de esteatosis, inflamación lobulillar y abombamiento de hepatocitos. Mientras que la escala METAVIR nos indica la progresión de la fibrosis en MASH. Elaboración propia en BioRender.com. ....	4
Figura 3. Fisiopatología implicada en el desarrollo de MASLD y MASH. Adaptado de Díaz et al., 2023 .	6
Figura 4. Síntesis de nanopartículas híbridas PLGA-HSPC-ALA (NPL-ALA) mediante el método de nanoprecipitación y autoensamblado. (1) Se preparan las solución de PLGA-ALA en acetonitrilo y HSPC en EtOH al 4 %. (2) Se agrega gota a gota el PLGA-ALA a la solución de HSPC. (3) La solución se lleva a sonicar por 7 min para obtener nanopartículas. (4) Las nanopartículas son purificadas por filtración mediante centrifugación. Imagen creada en Biorender.com. ....	12
Figura 5. Expresión de SEAP en la vía de señalización de TGF $\beta$ en células HEK-Blue TGF $\beta$ . La unión del ligando TGF $\beta$ 1 a los receptores tipo I y II permite la formación del complejo smad 3/4 permitiendo la transcripción de fosfatasa alcalina embrionaria. Imagen tomada de Invivogen.com. ....	16
Figura 6. Diagrama del inmunoensayo ligado a enzimas para la evaluación de proteínas. (1) Se coloca el anticuerpo de captura en la placa en donde se unirá la proteína. (2) Se agrega la muestra a evaluar. (3) Se añade el anticuerpo de detección que se une a la proteína. (4) El conugado de streptavidina-enzima se une al anticuerpo de detección. 5) colocamos la solución sustrato para desarrollar el color. 6) Analizamos a 450 nm. Modificado de Mabtech.com. ....	17
Figura 7. Suspensiones de nanopartículas. (A) Suspensión de nanopartículas recién sintetizadas, (B) Suspensión de nanopartículas almacenadas durante 30 días a 4°C. ....	21
Figura 8. Diámetro Hidrodinámico de nanopartículas híbridas mediante DLS. (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. PDI: Índice de polidispersidad. La incorporación de ALA aumento el tamaño promedio de la nanopartícula. ..	22
Figura 9. Carga superficial de nanopartículas híbridas mediante potencial Z. (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. La incorporación de ALA, aumento la carga negativa de la partícula. Las barras negras representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ....	22
Figura 10. Comprobación mediante FTIR del recubrimiento con HSPC de las nanopartículas híbridas. NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El espectro FTIR de las NPL-ALA muestran los picos característicos metil atribuidos al recubrimiento con HSPC. ....	23
Figura 11. Tamaño y morfología de nanopartículas híbridas obtenidas mediante TEM. (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. Las nanopartículas muestran una estructura núcleo (PLGA)/coraza (HSPC). ....	24

Figura 12. Viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de ALA. Control: fibroblastos humanos CCD-1112Sk intactos, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA es citocompatible en concentraciones hasta 5mM, obteniendo una viabilidad celular por encima del 80 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.05$  (\*), y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 25

Figura 13. Efecto en la viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk a las 24 h de exposición con diversos tratamientos. Control: fibroblastos humanos CCD-1112Sk sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). De acuerdo con lo establecido a la norma ISO 10993-5 las NPL y NPL-ALA son citocompatibles. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*) y  $0.001$  (\*\*\*) con respecto a la muestra control. .. 25

Figura 14. Efecto en la viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$  a las 24 h de exposición a diversos tratamientos. Control: células sin tratamiento, Control+TGF $\beta$ : fibroblastos humanos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$  a 10 ng/mL, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) La estimulación con TGF $\beta$  mostro no tener un efecto negativo en la viabilidad. (B) Los tratamientos evaluados mostraron ser citocompatibles de acuerdo con la ISO 10993-5. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. (A) T de Student con  $p < 0.05$  y (B) Anova de una vía con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 26

Figura 15. Efecto en la expresión de genes profibróticos en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$ . Control: células sin tratamiento, Control+TGF $\beta$ : fibroblastos humanos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$  a 10 ng/mL. La estimulación con TGF $\beta$  tiene un efecto en el aumento en la expresión relativa de todos los genes profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 27

Figura 16. Expresión de genes profibróticos en células CCD-1112Sk estimuladas con TGF $\beta$  a las 24 h de exposición con diferentes tratamientos. Control: Fibroblastos sin tratamiento Control+TGF $\beta$ : fibroblastos humanos CCD-1112Sk expuestos por 24 h con TGF $\beta$  a 10ng/mL, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las NPL-ALA muestran una disminución en la expresión relativa de todos los genes profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 28

Figura 17. Actividad de TGF $\beta$  para inducir la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en células HEK-Blue TGF $\beta$  tratadas con diversos tratamientos. HEK-Blue: células sin tratamiento, HEK-Blue+TGF $\beta$ : células estimuladas con 10 ng/mL por 24 h, Control: células estimuladas con 10 ng/mL por 24 h, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA:

nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) Efecto en la producción de SEAP en células HEK-Blue tras estimulación con TGF $\beta$  y (B) efecto de los diferentes tratamientos en inhibir la producción de SEAP. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. (A) T de Student con  $p < 0.05$  y (B) ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

..... 29

Figura 18. Viabilidad celular evaluada por MTT en células estrelladas hepáticas humanas (HHSC-N) tras 24 h de exposición a nanopartículas. Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA obtuvo una citocompatibilidad por encima del 80 %. Por otro lado, las NPL y NPL-ALA disminuyeron la viabilidad por debajo del 50 % respecto al control. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.001$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 30

Figura 19. Viabilidad celular evaluada por MTT en células estrelladas hepáticas humanas (HHSC-N) tras 24 h de exposición a diversas concentraciones de nanopartículas. Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) Observamos que independientemente de la concentración, las NPs tienen una baja citocompatibilidad sobre la línea celular HHSC-N. Por otra parte, en las fotografías (B) se observa una densidad celular del 80 % tratadas con NPL-ALA. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 30

Figura 20. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en células estrelladas hepáticas (HHSC-N) evaluado por azul tripano a las 24 h de exposición de diversos tratamientos. Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las diferentes concentraciones de NPL y NPL-ALA mostraron una citocompatibilidad por encima del 70 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*), 0.01 (\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 31

Figura 21. Análisis ELISA de la liberación de citocinas en células estrelladas hepáticas (HHSC-N). (A) ELISA de TNF- $\alpha$ , (B) ELISA de IFN- $\gamma$ , (C) e IL-1 $\beta$ . Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Ningún tratamiento tuvo diferencias significativas en la concentración de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Además, se aprecian aumentos en la expresión de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con NPL, NPL-ALA y ALA. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=2 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*) y  $< 0.001$  (\*\*\*). ..... 32

Figura 22. Efecto en la expresión de genes profibróticos en HHSC tras 24 h de tratamiento. Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA y Las NPL disminuyeron la expresión relativa de genes

profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 33

Figura 23. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en células estrelladas hepáticas (HHSC-N) evaluado por azul tripano a las 48 h de exposición de diversos tratamientos. Control: HHSC sin ningún tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Los tratamientos evaluados mostraron una citocompatibilidad superior al 80 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*) y 0.01 (\*\*). ..... 34

Figura 24. Efecto en la expresión de genes profibróticos en HHSC tras 48 h de tratamiento. Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL LALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las NPL-ALA tuvieron una disminución en la expresión relativa de PDGFR y TIMP. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*). ..... 35

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Componentes para la reacción RT-qPCR con el kit SensiFAST SYBR Lo-ROX One-step.....	19
2. Oligonucleótidos utilizados en fibroblastos CCD-1112Sk y HHSC-N. ....	19



## Capítulo 1. Introducción

---

La enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASDL, por sus siglas en inglés), anteriormente conocida como enfermedad por hígado graso no alcohólico, es una de las principales enfermedades hepáticas crónicas en todo el mundo (Rinella et al., 2023a). Esta afección se define por la presencia de  $\geq 5$  % de grasa en el hígado (esteatosis) en ausencia de consumo de alcohol o infección viral (Rinella et al., 2023b). La MASDL abarca la esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH) (anteriormente conocida como esteatohepatitis no alcohólica; NASH, por sus siglas en inglés) y la esteatosis simple (hígado graso no alcohólico; NAFL). La NAFL se caracteriza por la presencia de grasa en los hepatocitos con poca o nula evidencia de inflamación o daño. Mientras que MASH, además del acumulación de lípidos, presenta inflamación crónica, disfunción mitocondrial y lesión en los hepatocitos, lo que lleva al depósito excesivo de colágeno conocido como fibrosis y provocando la progresión a etapas más avanzadas de la enfermedad hepática como cirrosis y hepatocarcinoma (Mardinoglu et al., 2018; Sanyal, 2019).

Cuando el hígado está dañado, las células estrelladas hepáticas (HSC) se activan y se transdiferencian a miofibroblastos para la reparación de la lesión. Estas células al permanecer activas pueden migrar al área dañada, proliferar y producir una matriz de colágeno lo que resultan en la progresión de la fibrosis. Por lo tanto, las HSC son un objetivo clave para retrasar o detener la progresión de MASH (Tsuchida & Friedman, 2017). Algunos de los marcadores característicos de las HSC son la  $\alpha$ -actina de músculo liso, expresada en el gen ACTA2; la expresión de COL1A1 en la producción de matriz extracelular; PDGFR $\beta$ , que favorece la proliferación y activación continua de HSC; el inhibidor de metaloproteinasas (TIMP-1) que inhibe la degradación de la matriz extracelular por las metaloproteinasas (MMP) (Higashi et al., 2017).

Aunque se ha reportado que la fibrosis hepática es un proceso dinámico reversible, tanto en modelos experimentales como en humanos, el desarrollo de terapias antifibróticas sigue siendo difícil de alcanzar (Liu et al., 2013). En enfermedades crónicas como MASH, hay un aumento en el estrés oxidativo (incremento en especies reactivas de oxígeno) y de otras moléculas efectoras que promueven la activación de las HSC. El ácido alfa lipoico (ALA), un compuesto de ditiol natural sintetizado en la mitocondria, que tiene la capacidad de neutralizar radicales libres, tales como especies reactivas de oxígeno y que ejerce efectos protectores contra las enfermedades hepáticas crónicas debido a sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias (Ma et al., 2015). Además, en estudios realizados recientemente, se demostró una reducción en HSC activadas hasta en un 80 % en un modelo murino con daño inducido (El-Maadawy et al.,

2020). Sin embargo, el ALA y diversas estrategias terapéuticas que han mostrado un alto potencial en el laboratorio para el tratamiento de esta enfermedad han fallado en estudios preclínicos o clínicos, debido a su limitada biodisponibilidad y corto tiempo de vida media del fármaco.

La nanotecnología ofrece la posibilidad de reducir los retos que actualmente existen en la administración de fármacos y su efecto en enfermedades crónicas como MASDL. Los nanotransportadores permiten dirigir los fármacos al tipo de célula objetivo, así como una liberación controlada del fármaco, lo que permitiría reducir la citotoxicidad y mejorar la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos (Moghtadaie et al., 2023). Diversas nanopartículas han mostrado resultados prometedores, donde las nanopartículas híbridas de polímero/lípido (NPL) destacan su potencial terapéutico. Los polímeros pueden encapsular fármacos poco solubles y permitir la liberación prolongada del fármaco, mientras que la cubierta lipídica proporciona estabilidad a la nanopartícula evitando su degradación y permitiendo una liberación controlada del fármaco (Ghitman et al., 2020).

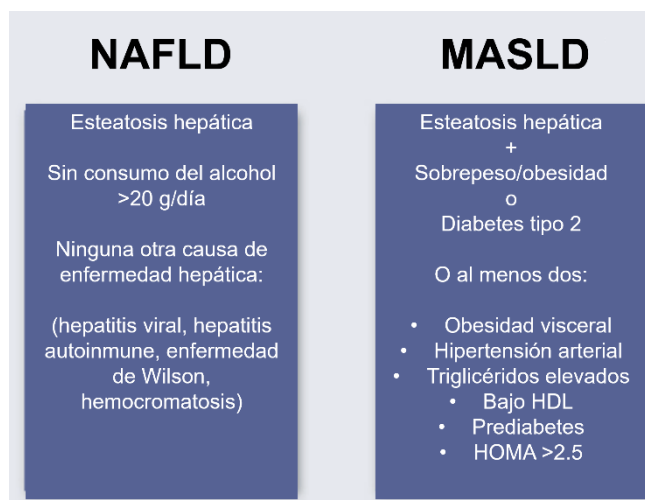
Por lo tanto, el propósito de este proyecto fue encapsular el ALA en NPL para estudiar su efecto en la regulación de la expresión de genes profibróticos como COL1A1, ACTA2, PDGFR $\beta$ , TGF $\beta$  y TIMP1 en un modelo *in vitro* de HSC aisladas de un paciente con la enfermedad de MASDL, lo cual permitiría reducir la heterogeneidad asociada a los fenotipos aplicados en modelos *in vivo* de MASDL (Cole et al., 2018). Este modelo nos permitió demostrar el potencial de la entrega de ALA encapsulado en NPLs al disminuir la expresión de genes relacionados con la progresión de la fibrosis tras 48 h de tratamiento.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Enfermedad esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASDL)

La enfermedad esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASDL, por sus siglas en inglés), anteriormente conocida como enfermedad por hígado graso no alcohólico, experimentó un cambio de nombre debido a la importancia de la nomenclatura y definición de las enfermedades para identificar factores de riesgo, facilitar el diagnóstico y el acceso a la atención médica (Rinella et al., 2023a). La denominación propuesta para esta enfermedad, MASDL, asociada a disfunciones metabólicas, busca una mejor comprensión de la etiología de la enfermedad. Además, se optó por el término "esteatósica" en lugar de "graso" para referirse a la acumulación de grasa en el hígado. La enfermedad ahora comprende

la presencia de esteatosis junto con factores de riesgo cardio-metabólicos (Figura 1) (Bugianesi & Petta, 2022; Rinella et al., 2023a).

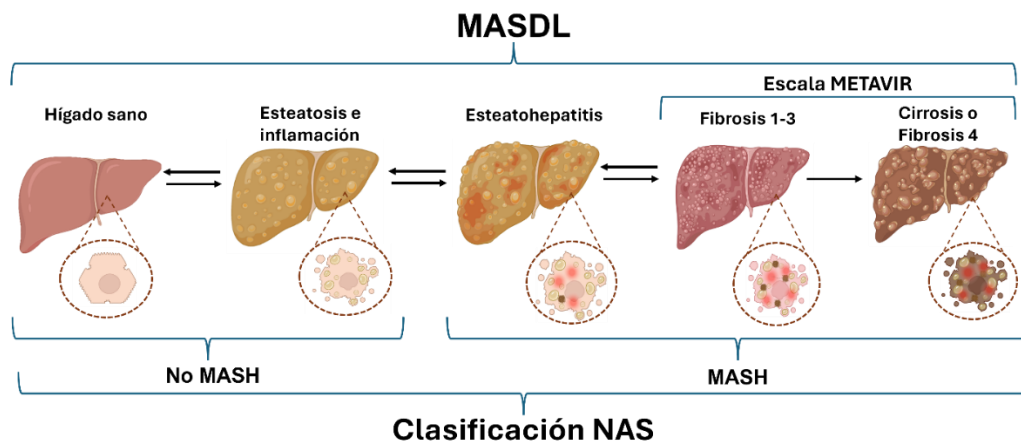


**Figura 1. Etiología de NAFDL a MASDL.** Adaptado de Bugianesi & Petta, 2022.

MASDL tiene una prevalencia que es paralela a la edad, el desarrollo de sobrepeso/obesidad y a la diabetes mellitus tipo2 (DM2). Se estima que a nivel mundial se encuentra aproximadamente en el 25 % de la población y aumenta a más del 50 % en grupos de alto riesgo como los pacientes diabéticos y obesos (Brunt et al., 2015; Younossi et al., 2016). México es uno de los países cuya población reúne estos factores de riesgo. En 2021, la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la asociación Mexicana de Hepatología estimaron que la prevalencia actual de MASDL podría superar el 40 % de la población (Bernal-Reyes et al., 2023). Además es preocupante que cerca del 40 % de la población con MASDL, según análisis mediante Fibroscan®, tenga fibrosis avanzada, ya que esto es un factor importante para la progresión a cirrosis. Esta enfermedad representa un serio problema de salud pública debido a la alta prevalencia de comorbilidades metabólicas. Se estima que para el año 2030, será la principal causa de carcinoma hepatocelular y ocupará la primera posición entre las indicaciones de trasplante hepático (Asrani et al., 2019; Younossi et al., 2016).

Al principio, el espectro de la enfermedad MASLD, se caracteriza por la acumulación de grasa dentro de los hepatocitos del hígado. Sin embargo, este fenotipo puede progresar a esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH), una afección grave que incluye esteatosis, inflamación y agrandamiento de los hepatocitos con o sin fibrosis. Si no se trata, la MASH resulta en la acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular que puede progresar hasta convertirse en cirrosis o carcinoma hepatocelular, lo que a menudo resulta en un trasplante de hígado o la muerte (Marchesini et al., 2016). Este espectro de enfermedades se clasifica de acuerdo con la puntuación de actividad de NAFDL (NAS), donde NAS puede

variar de 0 a 8 y se calcula mediante la suma de las puntuaciones de esteatosis (0-3), inflamación lobulillar (0-3) y abombamiento de hepatocitos (0-2). En pacientes con MASDL, una puntuación NAS  $\geq 5$  se correlaciona fuertemente con un diagnóstico de "MASH", mientras que una puntuación NAS  $\leq 3$  se correlaciona con un diagnóstico de "no MASH" (Kleiner et al., 2005). Por otro lado, la escala METAVIR nos indica la progresión de la fibrosis en sus 5 estadios de la enfermedad: F0 (ausencia de fibrosis), F1 (fibrosis portal), F2 (fibrosis periportal), F3 (puentes de fibrosis entre espacios portal) y F4 (cirrosis) (Figura 2) (Carrión, 2009).



**Figura 2. Espectro de la enfermedad esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASDL).** La escala NAS mide la progresión de la enfermedad a través de esteatosis, inflamación lobulillar y abombamiento de hepatocitos. Mientras que la escala METAVIR nos indica la progresión de la fibrosis en MASH. Elaboración propia en BioRender.com.

### 1.1.2 Esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH) y fibrosis

La esteatohepatitis asociada a la disfunción metabólica (MASH) representa el estado avanzado de MASDL y es una enfermedad multifactorial compleja. La primera hipótesis considera que el desarrollo de esta enfermedad inicia por la esteatosis como primer golpe que no es suficiente para inducir inflamación y fibrosis; sin embargo la esteatosis conduce al estrés oxidativo lo que produce la inflamación en el hígado (Downman et al., 2010). Mientras que una hipótesis más reciente, nombrada "hipótesis de golpes múltiples" sugiere que los hábitos alimenticios, el estilo de vida y los factores genéticos pueden conducir al desarrollo de la resistencia a la insulina, mientras que la obesidad influye en la proliferación de adipocitos y en el microbioma intestinal (Buzzetti et al., 2016).

La resistencia a la insulina es uno de los factores clave en el desarrollo de la esteatosis, lo que resulta en un aumento de la lipogénesis hepática de *novo* y una inhibición en la lipólisis del tejido adiposo, con

aumento de ácidos grasos dirigidos al hígado. (Bugianesi et al., 2010). Esta acumulación de grasa en el hígado en forma de triglicéridos, junto con la presencia elevada de ácidos grasos, colesterol y otras moléculas lipídicas libres, conduce a la lipotoxicidad, que promueven el daño y la disfunción celular a través del RE, disfunción mitocondrial y regulación de procesos autofágicos. El daño celular resultante está asociado a la secreción de citocinas inflamatorias y a la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), lo cual es fundamental para desencadenar la inflamación y fibrosis (Huby & Gautier, 2022; Sanyal, 2019). Una vez que se produce la inflamación, se activan los macrófagos residentes (Células de Kupffer) y se reclutan células del sistema inmune que amplifican la respuesta inflamatoria, lo que produce una mayor muerte celular al activarse diferentes vías de señalización como apoptosis, necrosis, piroptosis y ferroptosis (Gautheron et al., 2020). Estos mecanismos de muerte celular implican una liberación de los contenidos celulares, lo que desencadena una mayor inflamación que contribuye en la progresión de MASH (Sanyal, 2019). En este punto, el hígado sigue intentando reparar el daño mediante la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC), que producen y depositan matriz extracelular (MEC) en el sitio de la herida y una vez que los hepatocitos se recuperan, las proteínas de MEC son degradadas por metaloproteinasas. Sin embargo, al estar en un inflamación crónica, esto propicia la continua activación de HSC y la deposición excesiva de matriz extracelular, lo que provoca cicatrices y rigidez en el tejido que es conocido como fibrosis y progresar hasta cirrosis (Figura 3) (Cordero-Espinoza & Huch, 2018).

### 1.1.3 Fibrosis y células estrelladas hepáticas (HSC)

La fibrosis hepática es el resultado de la inflamación crónica, indicando la progresión de MASH. Este cambio y aumento en la composición de la matriz extracelular remodelan la arquitectura del hígado, perjudicando sus funciones y alterando el flujo sanguíneo, pudiendo progresar hasta cirrosis (Hammerich & Tacke, 2023). Durante MASH, las células estrelladas hepáticas (HSC) juegan un papel crucial en la fibrogénesis hepática. Las HSC son células mesenquimales y comprenden alrededor del 5-10 % del total de células del tejido hepático, estando inactivas en un hígado sano y normal. En el hígado con MASH, las HSC inactivas se activan por factores inflamatorios y de estrés oxidativo persistente debido al microambiente hepático alterado. Las HSC activadas exhiben capacidades de proliferación, migración y propiedades similares a un miofibroblasto, que secretan altas cantidades de matriz extracelular que se acumula y contribuye a la fibrosis hepática (Tsuchida & Friedman, 2017). Tras su activación, las HSC expresan el marcador  $\alpha$ -SMA (ACTA2), producen colágeno tipo 1 (COL1A1) e inhibidores de la degradación de colágeno (TIMP) (Hammerich & Tacke, 2023).

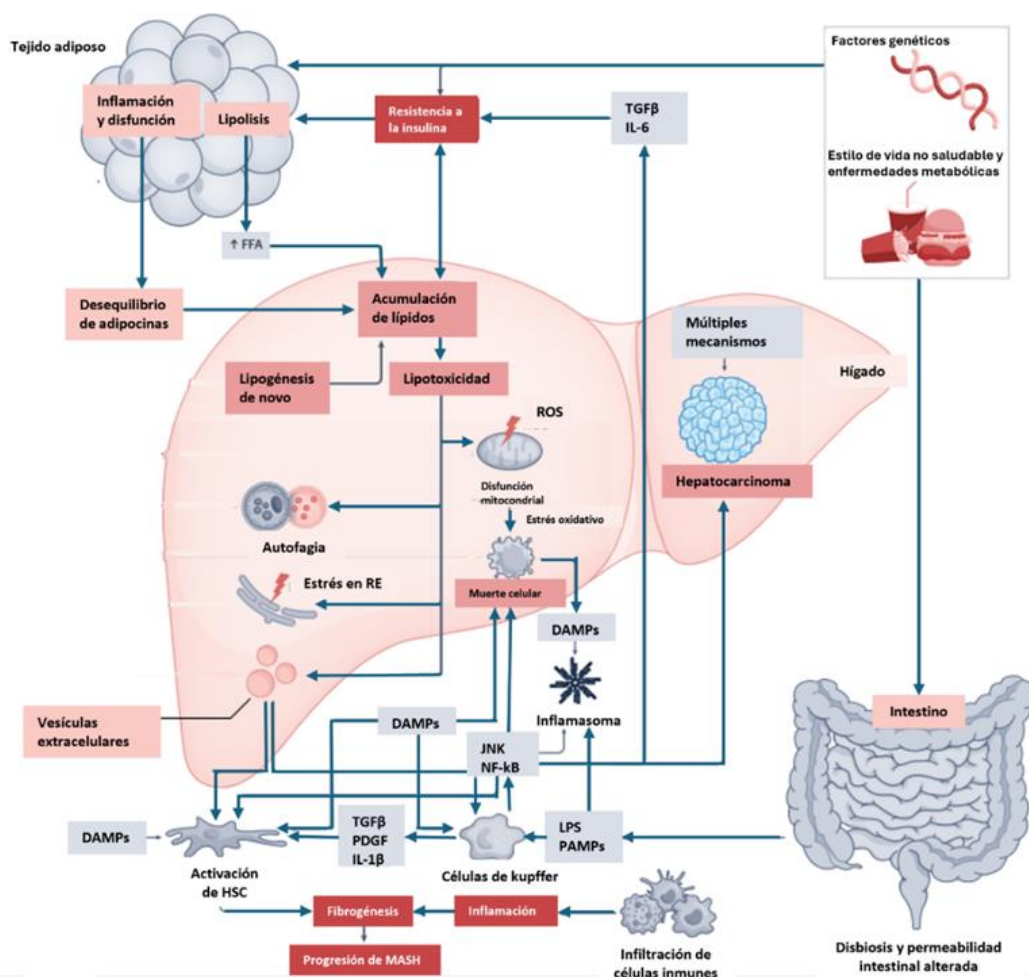


Figura 3. Fisiopatología implicada en el desarrollo de MASLD y MASH. Modificado de Díaz et al., 2023.

Las HSC activadas se caracterizan por una sobreexpresión de genes relacionados con la MEC, pero difieren en su capacidad de producir citocinas y quimiocinas. En hígados fibróticos se han encontrado HSC inactivas (o débilmente activadas) que expresan factores que suprimen la inflamación y fibrosis del hígado. Mientras que las HSC altamente activas promueven la fibrosis hepática (Krenkel et al., 2019). Las HSC pueden activarse a través de diversas señales, incluido el contacto célula-célula con macrófagos, citocinas derivadas de células inmunes, vesículas celulares de los hepatocitos y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs).

Uno de los factores fibrogénicos más estudiados es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Este factor estimula la transdiferenciación de las HSC y su vía de señalización produce el aumento de genes relacionado con la MEC, como COL1A1 y ACTA2 (Dewidar et al., 2019). Además de su función fibrogénica durante la progresión de la enfermedad, puede depositarse en la MEC (TGF $\beta$  latente) y activarse en un

momento posterior a través de la contracción para continuar perpetuando la activación de las HSC (Hammerich & Tacke, 2023). Por otro lado el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se ha asociado con funciones fibrogénicas, donde a través del receptor  $\beta$  de PDGF de las HSC se promueve la proliferación, la migración y supervivencia de estas células (Wong et al., 1994).

#### 1.1.4 Ácido alfa lipoico

El ácido alfa lipoico (ALA, ácido 1,2-ditiolan-3-pentanoico), así como su forma reducida, el ácido dihidrolipoico (DHHLA), tienen la capacidad de actuar como compuestos antioxidantes debido a su capacidad de eliminar e inactivar los radicales libres, quelación de metales tóxicos tanto directa como indirectamente por su capacidad para mejorar los niveles de glutatión intracelular (GSH) y con ello la restauración de diversos antioxidantes (El-Maadawy et al., 2020; Foo et al., 2011).

Estas propiedades antioxidantes son importantes durante la progresión de MASH, ya que la patogénesis de esta enfermedad está asociada al aumento del estrés oxidativo, así como la activación de las HSC. Durante MASH la acumulación excesiva de lípidos conduce a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que genera la muerte de los hepatocitos y permite la liberación de factores que activan las HSC (El-Maadawy et al., 2020; Luo & Shen, 2020).

En un estudio *in vitro* con células HepG2 tratadas con ácido palmítico y ácido oleico para inducir esteatosis, tuvieron un efecto positivo al ser tratadas con ALA que disminuyó el estrés del retículo endoplasmático y la disfunción mitocondrial que están asociadas a la muerte de células en los hepatocitos (Longhitano et al., 2024).

Por otra parte en un modelo murino de fibrosis inducido por tioacetamida (TAA), el ALA mostró efecto antifibrótico al disminuir la expresión de PDGF y TGF $\beta$  lo que permite bloquear la activación y proliferación de las HSC activadas y con ello también reducir la expresión de  $\alpha$ -SMA que está asociado al marcador de transdiferenciación de las HSC (El-Maadawy et al., 2020). Sin embargo, es necesario conseguir los niveles plasmáticos necesarios para obtener un efecto y esto se ve comprometido por el rápido metabolismo del ALA (30 min en plasma) y su baja biodisponibilidad del 30 % (Tibullo et al., 2017).

### 1.1.5 Nanopartículas híbridas

Las nanopartículas híbridas de polímero y lípidos (NPL), son sistemas de administración de fármacos que surgen a partir de las propiedades físicas y químicas de ambos materiales. Este tipo de nanopartículas muestran las características biomiméticas, así como la encapsulación de compuestos lipofílicos de los lípidos.

Mientras que las ventajas de los polímeros al poder entregar el compuesto bioactivo mediante una manera activa o pasiva y las propiedades para la liberación de compuestos de manera sostenida. Las nanopartículas de un núcleo polimérico biodegradable que encapsula los compuestos bioactivos y que se encuentra dentro de una cubierta lipídica reduce la tasa de degradación del PLGA al limitar la difusión de agua dentro de la partícula, determinando una mayor protección para el compuesto y permitiendo una liberación más controlada. Además de la cubierta de lípidos estos nanosistemas se pueden añadir diferentes compuestos para la conjugación de diversos ligandos y proporcionar entregas dirigidas de fármacos.

El uso de poli (D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA), un polímero biodegradable y biocompatible que la FDA aprueba para aplicaciones biomédicas en humanos ha demostrado que la encapsulación de la curcumina cargada en nanopartículas PLGA reducían la acumulación de triglicéridos en un modelo *in vitro* de MASH en células HepG2 (Jazayeri-Tehrani et al., 2019).

En otro estudio *in vitro* de MASH con células HepG2 se prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con resveratrol en donde se obtuvieron nanopartículas de 180 nm y con un 95 % de eficiencia de encapsulación, para verificar que sus resultados no se vieran comprometidos se realizaron ensayos de viabilidad, tanto las nanopartículas como el compuesto libre mostraron viabilidades superiores al 85 % hasta una concentración de 100  $\mu$ M. No obstante, las nanopartículas cargadas con resveratrol mostraron un mayor efecto en aliviar la lipogénesis y promover la lipólisis comparado con el resveratrol libre (Wan et al., 2018).

## 1.2 Justificación

La presente revisión de literatura se enfoca en el desarrollo de la enfermedad esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASDL), una condición que afecta al 30 % de la población mundial. En diversos



estudios realizados en México por la asociación mexicana de gastroenterología y hepatología, se estima que la prevalencia podría superar el 50 % debido al alto índice de obesidad, diabetes y/o altos niveles de triglicéridos en la población. La literatura indica que estos factores son críticos ya que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad, progresar a fibrosis e incluso desencadenar cirrosis o insuficiencia hepática.

Esta enfermedad se caracteriza por una acumulación de lípidos, inflamación crónica y fibrosis. Varios estudios han investigado la importancia de los hepatocitos y células de Kupffer, que cuando son estimulados por factores como un estilo de vida no saludable o enfermedades metabólicas, permiten la activación de células estrelladas hepáticas mediante diversas moléculas, lo que lleva al depósito fibrótico. Aunque los estudios nos indiquen que las HSC no son las más abundantes en el hígado sano, son las principales efectoras de la progresión de fibrosis, por lo que su regresión a su estado inactivo es crucial para la resolución de esta enfermedad. Por lo tanto, en este estudio nos centramos en la evaluación de HSC de un paciente diagnosticado con la esteatohepatitis no alcohólica (MASH).

Otro reto al que nos enfrentamos para el tratamiento de esta enfermedad es incrementar la biodisponibilidad de los fármacos para su entrega, en la literatura se han evaluado diversas moléculas con potencial terapéutico, muchas de ellas fracasando en las evaluaciones preclínicas debido a la baja biodisponibilidad o eficiencia del compuesto bioactivo. Por lo tanto, diversos estudios mencionan que el trasplante de hígado se considera como la opción de terapia más eficaz. Sin embargo, los datos registrados muestran la escases de donadores y los costos elevados, lo que disminuye la posibilidad de esta opción terapéutica. En respuesta a esta necesidad, la nanomedicina ha investigado y desarrollado transportadores eficientes para la entrega de fármacos, como las nanopartículas híbridas polímero/lípido. Estas nanopartículas podrían incrementar la estabilidad y liberación prolongada de compuestos bioactivos.

Por estas razones, en este trabajo se planteó evaluar el efecto del ácido alfa lipoico, una molécula antioxidante con potencial de inhibir citocinas profibróticas en un modelo de células estrelladas hepáticas de un donador con MASH. Por lo tanto este trabajo tuvo la siguiente hipótesis y objetivos de tesis basados en la previa revisión de literatura.

### **1.3 Hipótesis**

Las nanopartículas híbridas PLGA/Lecitina de soya modularán la fibrosis mediante la liberación de ácido alfa lipoico en un modelo *in vitro* de fibrosis hepática.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Determinar mediante un modelo *in vitro* de fibrosis hepática, el efecto del ácido alfa lipoico liberado a partir de nanopartículas híbridas PLGA/lecitina de soya (PLGA/HSPC-ALA).

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de PLGA/HSPC-ALA mediante el método de nanoprecipitación y autoensamblado para su evaluación en un modelo *in vitro* de esteatohepatitis no alcohólica.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas PLGA/HSPC-ALA para determinar los resultados para su uso en un modelo *in vitro*.
3. Determinar el efecto de las nanopartículas de PLGA/lecitina de soya en un modelo *in vitro* de esteatohepatitis mediante el análisis de expresión de genes relacionados con la fibrosis, como COL1A1, TGF $\beta$ , TIMP1 y PDGFR.

## Capítulo 2. Metodología

---

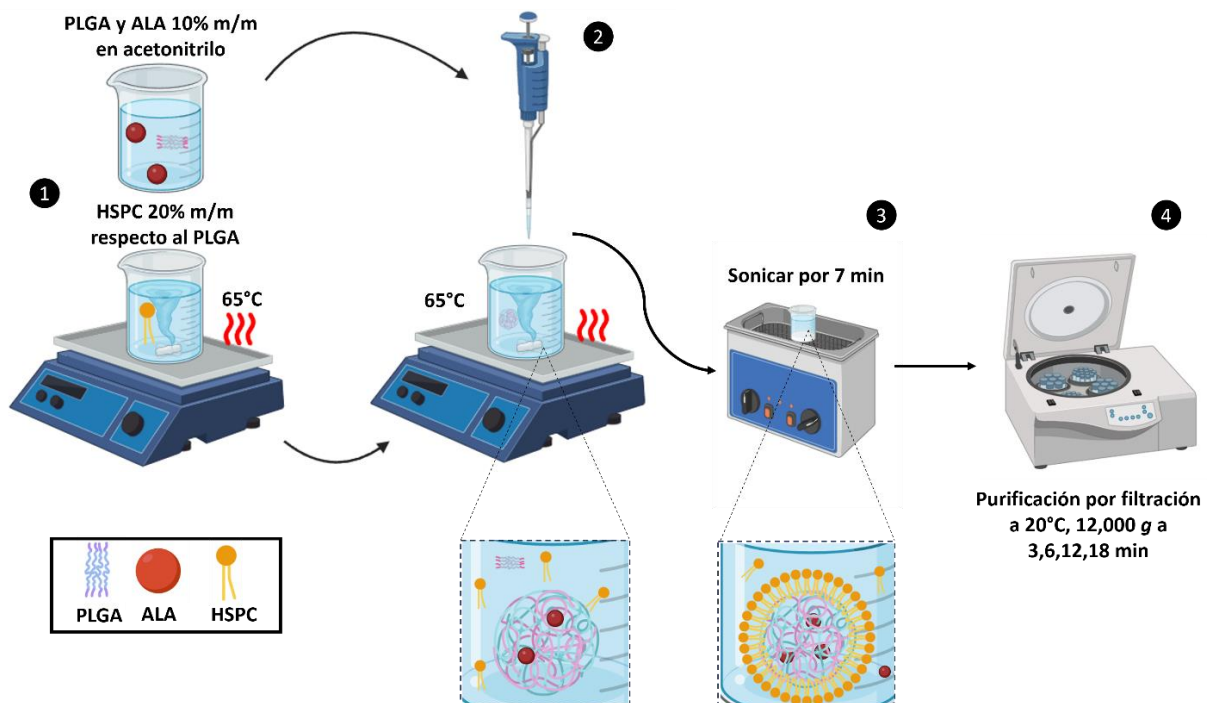
### 2.1 Síntesis de nanopartículas híbridas

Las nanopartículas híbridas de PLGA-HSPC (NPL) y cargadas con ácido alfa lipoico NPL-ALA se sintetizaron mediante el método de nanoprecipitación y autoensamblado modificado, también conocido como desplazamiento de disolvente (Fang et al., 2010; Quintanar-Guerrero et al., 1998). Este método ha sido ampliamente reconocido por su alta reproducibilidad en la síntesis de nanopartículas poliméricas.

Para la síntesis de NPL, se utilizó una fase orgánica compuesta por PLGA (Nanosoft polymers, 11088-20-50K-50:50) disuelto en acetonitrilo. Para las NPL-ALA se incorporó el ALA en la solución mencionada a una concentración del 10 % (m/m) respecto al PLGA. La fase acuosa consistió en disolver HSPC (Nanosoft Polymers, 26372) en agua Milli-Q con etanol al 4 % y calentándola a 65 °C hasta obtener una completa disolución. La relación de la fase orgánica a acuosa se ajustó a 1:10, siguiendo los protocolos establecidos (Chan et al., 2009; Fang et al., 2010).

Para comenzar con la síntesis de nanopartículas se realizó una solución de PLGA en acetonitrilo a una concentración de 2.5 mg/mL y se homogenizó por vórtex; se preparó una solución stock de HSPC a 1 mg/mL en etanol al 4 % a 65 °C. Posteriormente, en un vaso de precipitado de 10 mL se agregaron 2 mL de EtOH al 4 % y 400 µL de la solución stock de HSPC, dejándose en agitación magnética a 180 rpm hasta alcanzar los 65 °C. Para tener una proporción 20 % (m/m) de HSPC respecto al PLGA, se agregaron 800 µL gota a gota de la solución orgánica de PLGA a la fase acuosa con HSPC, seguido de 6.1 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q bajo agitación a 200 rpm a 65°C. Posteriormente, se aplicó baño ultrasónico (Branson 5800) a una frecuencia de 42 kHz durante 7 min. Para purificar las nanopartículas y eliminar moléculas libres, se utilizó centrifugación a 12,000 *g* con filtros Microsep Advance (Cytiva/Pall Life Sciences, MCP010C46) con un límite de peso molecular de 10 kDa. El primer filtrado de 3 min y después 4 lavados con agua Milli-Q de 10 min.

El control de temperatura se mantuvo mediante baño maría y monitoreo constante con termómetro. Estos procesos se llevaron a cabo para asegurar la reproducibilidad y calidad de las nanopartículas sintetizadas, como se detalla en la Figura 4.



**Figura 4. Síntesis de nanopartículas híbridas PLGA-HSPC-ALA (NPL-ALA) mediante el método de nanoprecipitación y autoensamblado.** (1) Se preparan la solución de PLGA-ALA en acetoneitrilo y HSPC en EtOH al 4 %. (2) Se agrega gota a gota el PLGA-ALA a la solución de HSPC. (3) La solución se lleva a sonicar por 7 min para obtener nanopartículas. (4) Las nanopartículas son purificadas por filtración mediante centrifugación. Imagen creada en Biorender.com.

## 2.2 Caracterización de nanopartículas híbridas

### 2.2.1 Diámetro hidrodinámico y potencial Z

Para llevar a cabo la evaluación del diámetro hidrodinámico y potencial Z se utilizó el equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, UK). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente utilizando agua Milli-Q como medio dispersante y considerando un índice de refracción de 1.33.

Las nanopartículas se evaluaron en suspensión a una concentración de 1 mg/mL y se les homogenizó mediante micropipeta. Posteriormente se transfirieron 500  $\mu$ L de cada suspensión a la celda capilar para realizar la medición mediante el Zetasizer Nano-Zs. Además, a través del DLS se obtuvo el índice de polidispersidad (PDI) que nos refleja la distribución de tamaño de las partículas, de tal modo que valores superiores a 0.7 indican que la muestra posee una amplia distribución de tamaños.

### 2.2.2 Identificación de grupos funcionales

Se analizaron los grupos funcionales de las nanopartículas a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) mediante un espectrómetro Cary 630 FTIR-ATR diamante, ZnSe (Agilent Technologies, EUA). La posición de las bandas en los espectros proporcionó información sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales de una molécula, además de una huella específica de cada compuesto que en conjunto nos permitiría identificar la identidad de una muestra. Las nanopartículas fueron previamente liofilizadas y posteriormente identificadas mediante un espectrómetro infrarrojo utilizando reflectancia total atenuada (ATR) en un rango de 4,000-600  $\text{cm}^{-1}$  de número de onda.

### 2.2.3 Morfología y tamaño

La estructura y morfología de las nanopartículas se analizaron usando un TEM-Hitachi 7500 y una aceleración de voltaje de 80 kV. Las muestras fueron preparadas, depositando la suspensión de nanopartículas en rejillas Lacey F/C 300 mesh en donde permanecieron durante 10 min, posteriormente se eliminó el excedente y las rejillas fueron teñidas negativamente durante 2 min con acetato de uranilo al 1 % (m/v). Tras retirar el excedente, se dejó secar durante 60 min. Se obtuvieron imágenes de TEM con aumentos de 25-100  $\times 10^3$  y se sometieron a un análisis mediante ImageJ para determinar el tamaño de las partículas.

## 2.3 Fibroblastos dérmicos humanos

Los fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato CCD-1112Sk (ATCC, Virginia, EUA) se manejaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se empleó medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico/antimicótico al 1 %. Siguiendo las recomendaciones del proveedor, se trabajó con las células entre los pases 8 y 13 para garantizar que las células no se encontraran senescentes y obtener resultados confiables.

## 2.4 Células estrelladas hepáticas humanas de un paciente con MASH

Se utilizaron células estrelladas hepáticas humanas (HHSC) de un donador masculino de 55 años con MASH en pase 3 (HHSC-N) (Cat. MD-0014, iXCells Biotechnologies, San Diego, USA). Las células almacenadas en

criovial se encontraban en fase 3 y fueron manejadas de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se empleó un medio basal de cultivo para células estrelladas hepáticas suplementado con 10 % de SFB, 1 % de Pen-Strep y 1 mL de suplemento de crecimiento específico para HHSC de iXCells Biotechnologies. Siguiendo las recomendaciones del proveedor, se trabajó con las células hasta tres pases más para garantizar que las células no se encontraran senescentes y obtener resultados confiables. Posteriormente, las células se adaptaron a crecer en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

## 2.5 Estudios de citocompatibilidad

Se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (número CAS 298-93-1) en las líneas celulares CCD-1112Sk y HHSC-N. Además, para HHSC-N, la viabilidad celular también se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano (15250061, Thermofisher). Las células se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Pen-Strep).

### 2.5.1 Viabilidad celular mediante MTT

Se comenzaron sembrando  $1 \times 10^4$  células por pozo para las líneas celulares CCD-1112Sk y HHSC-N en placas de 96 pozos, utilizando 100  $\mu$ L de medio completo (DMEM) y dejándose incubar durante 24 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión celular. Posteriormente se retiró el medio, se agregó el tratamiento a evaluar en un volumen de 100  $\mu$ L y se incubaron por 24 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ L de MTT a 5 mg/mL y se incubó durante 4h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> para formar los cristales de formazán en células metabólicamente activas. Los cristales se solubilizaron con 100  $\mu$ L de ácido clorhídrico (HCl) a 0.01 M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % (m/v) y se incubó entre 18 a 24 h para posteriormente leer la densidad óptica a 570 nm mediante un espectrofotómetro y determinar el porcentaje de viabilidad celular mediante la siguiente ecuación (1):

$$Viabilidad (\%) = \frac{D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ blanco}}{D.O. \text{ control}} \times 100\% \quad (1)$$

Donde: D.O. <sub>muestra</sub> y D.O. <sub>blanco</sub> son los valores de la muestra y blanco, respectivamente, a las 24 h. D.O. <sub>control</sub> corresponde al control que no se aplicaron tratamientos. La diferencia entre D.O. <sub>muestra</sub> y D.O. <sub>blanco</sub> proporcionan la absorbancia del vehículo o compuesto, la cual ha sido removida.

## 2.5.2 Viabilidad celular mediante azul tripano en HHSC-N

Para evaluar el efecto de nuestros tratamientos en la viabilidad celular de las HHSC-N, se sembraron  $7.5 \times 10^4$  células por pozo para la línea celular HHSC-N en placas de 24 pozos con 500  $\mu\text{L}$  de medio completo (DMEM). Tras 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  para la adherencia celular, se retiró el medio, y se agregó el tratamiento a evaluar en un volumen de 500  $\mu\text{L}$ , se incubó por 24 y 48 h a 37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se recolectó el sobrenadante y las células, se centrifugó a 500 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 mL de PBS (pH 7.4). Después se mezcló una relación 1:1 de suspensión celular con solución de azul de tripano al 0.4 % m/v (15250061, Thermofisher), y se colocaron 10  $\mu\text{L}$  en el hemocitómetro para llevar a cabo el recuento de células vivas y muertas bajo un microscopio.

Una vez realizado el conteo celular, se calculó la viabilidad celular en porcentaje siguiendo la siguiente ecuación (2):

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células vivas} + \text{Células muertas}} \times 100\% \quad (2)$$

## 2.6 Ensayo Indicador del efecto neutralizante de TGF $\beta$ en células HEK-blue TGF $\beta$

Para evaluar la vía de señalización de TGF $\beta$  se utilizó la línea celular HEK-Blue TGF $\beta$  (InvivoGen, San Diego, California) la cual permite la detección de TGF $\beta$  mediante la secreción de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) (Figura 5). SEAP puede ser evaluada mediante la solución QUANTI-Blue™ y al ser un reactivo colorimétrico, permite su detección de SEAP mediante un espectrofotómetro a 655 nm.

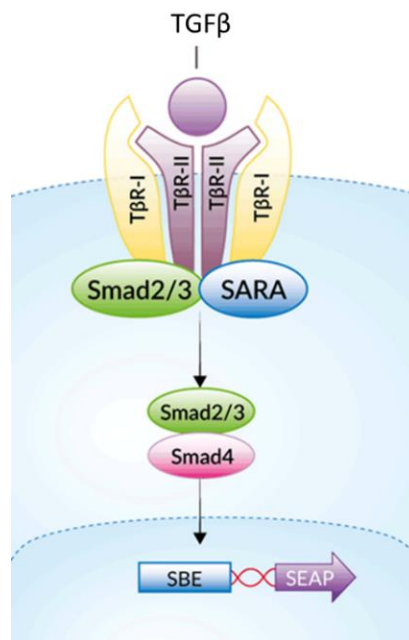
Las células se mantuvieron de acuerdo con el protocolo del proveedor, con los dos primeros pases en medio DMEM suplementado con 10 % FBS, 1 % Pen-Strep y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Normocina. Después de dos pases se agregaron 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Higromicina B Gold, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Blastidina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Zeocin como antibióticos de selección. Para llevar a cabo el ensayo, se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de tratamiento a evaluar en una placa de 96 pozos, seguido de 20  $\mu\text{L}$  de TGF $\beta$  a 10 ng/mL para estimular a las células y por último se añadieron 45,000 células en 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM completo sin antibióticos. La placa se incubó por 18 h a 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada pozo a una nueva placa

con 180  $\mu\text{L}$  de solución QUANTI-Blue por pozo y se incubó por 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  para finalmente leer la densidad óptica a 655 nm en el espectrofotómetro de placas EPOCH. Se incluyó un control de células tratadas con TGF $\beta$  a 10 ng/mL y otro con células sembradas omitiendo el TGF $\beta$ .

La vía de señalización de TGF $\beta$  fue evaluada mediante la siguiente ecuación (3):

$$D.O._{SEAP} = D.O._{muestra} - D.O._{blanco} \quad (3)$$

Donde: D.O. muestra y D.O. blanco son los valores de la muestra y blanco, respectivamente. Los valores se compararon con la lectura de una muestra control. La diferencia entre D.O. muestra y D.O. blanco proporcionan la absorbancia del vehículo o compuestos, la cual ha sido removida.



**Figura 5. Expresión de SEAP en la vía de señalización de TGF $\beta$  en células HEK-Blue TGF $\beta$ .** La unión del ligando TGF $\beta$ 1 a los receptores tipo I y II permite la formación del complejo smad 3/4 permitiendo la transcripción de fosfatasa alcalina embrionaria. Imagen tomada de Invivogen.com.

## 2.7 Detección de citocinas en HHSC-N

Para la detección de citocinas en HHSC-N, se realizó el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) que permite la cuantificación de una proteína, péptido u hormona de interés. Para este ensayo se utilizaron ELISA tipo sándwich el cual está compuesto por un anticuerpo de captura que se adhiere a la placa de 96 pocillos y se une a la molécula de interés. A su vez, el anticuerpo de detección está conjugado con una enzima que



requiera la adición de un sustrato para desarrollar color (Figura 6). De esta forma, las muestras con una mayor concentración de antígeno mostrarán un color más oscuro.



**Figura 6. Diagrama del inmunoensayo ligado a enzimas para la evaluación de proteínas.** (1) Se coloca el anticuerpo de captura en la placa en donde se unirá la proteína. (2) Se agrega la muestra a evaluar. (3) Se añade el anticuerpo de detección que se une a la proteína. (4) El conjugado de streptavidina-enzima se une al anticuerpo de detección. (5) colocamos la solución sustrato para desarrollar el color. (6) Analizamos a 450 nm. Modificado de Mabtech.com.

Para realizar el ensayo ELISA se utilizaron los kits de TNF- $\alpha$  (KIT10602, SinoBiological) e IFN- $\gamma$  (KIT11725A, SinoBiological) realizando diluciones seriadas 1:1 de 23 hasta 2,000 pg de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Posteriormente, las placas que incluyen el anticuerpo de captura fueron colocadas a temperatura ambiente por 30 min. Se realizaron 3 lavados con 300  $\mu$ L buffer de lavado a la placa y se agregó 100  $\mu$ L de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  así como de la muestra a evaluar en diferentes pozos. Se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación se realizaron 3 lavados con 300  $\mu$ L de buffer de lavado y agregamos 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Por último, realizamos 3 lavados con buffer de lavado, agregamos la solución sustrato e incubamos por 20 min para agregar la solución de paro que nos permitirá visualizar el cambio de color dependiente de la concentración de la molécula evaluada. Finalmente, la placa fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro.

## 2.8 Análisis de expresión de genes profibróticos

La evaluación de la expresión de genes profibróticos comenzó con la extracción de ARN utilizando TRI reagent (Sigma aldrich, T9424). Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células por pozo en placas de 6 pozos con 2 mL de medio completo (DMEM) y se incubaron durante 24 h a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Tras retirar el medio, se agregó el tratamiento a evaluar en un volumen de 2 mL y se incubaron nuevamente por 24 o 48 h. Al concluir este periodo, se retiró el tratamiento y se lavó cada pozo con 1 mL de PBS (pH 7.4).

Posteriormente, se agregaron 400 µL de TRI reagent y cada pozo fue raspado con la punta de la micropipeta para lisar las células. La suspensión celular se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se dejó reposar durante 5 min. Luego, se añadieron 40 µL de Bromo-3-Cloropropano, agitando suavemente durante 15 s y se dejó reposar durante 5 min antes de centrifugar a 12,000 g por 5 min a 4 °C.

Una vez formadas las diferentes fases en el tubo eppendorf, se transfirió la fase acuosa (que contiene el ARN) a un nuevo tubo de 1.5 mL y se le agregaron 200 µL de isopropanol, la muestra reposó durante 10 min y se centrifugó (12,000 g, 10 min a 4 °C). Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 400 µL de EtOH al 75 %. La muestra se agitó y se centrifugó (9,500 g, 5 min a 4 °C).

Finalmente, se retiró el sobrenadante por decantación y el pellet se dejó secar de 5 a 10 min antes de ser resuspendido en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). La muestra se analizó mediante electroforesis y espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para evaluar la calidad y cantidad de la extracción de ARN.

Una vez obtenido el ARN, se llevó a cabo la retro-transcripción de ARN a cDNA así como las reacciones de qPCR mediante el kit SensiFAST SYBR Lo-ROX One-step (Meridian bioscience, BIO-74005) el cual realiza la retro-transcripción y qPCR en un solo paso (Tabla 1). Para los ensayos de qPCR se analizaron los siguientes genes profibróticos que se muestran en la (Tabla 2).

Para comenzar se ajustó el ARN a 100 ng por reacción para normalizar las reacciones, el volumen final de reacción fue de 10 µL.

Cada reacción se realizó por triplicado en placas de reacción óptica de 96 pozos y película adhesiva Bio-rad y se corrió en el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El ciclo termal de la retrotranscripción constó de un ciclo de 45 °C por 10 min,

posteriormente se activó la polimerasa en un ciclo de 95 °C por 2 min, después un ciclo de 95 °C por 10 s y 65 °C por 30 s durante 40 ciclos. Las curvas de desnaturalización fueron monitoreadas sistemáticamente (temperatura de gradiente de 0.5°C cada 10 s desde 55 a 94°C) al final del último ciclo de amplificación para confirmar la especificidad de reacción de amplificación.

**Tabla 1. Componentes para la reacción RT-qPCR con el kit SensiFAST SYBR Lo-ROX One-step**

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
<b>2x SensiFAST™ SYBR Lo-ROX One-Step Mix</b>	5 µL	1x
<b>10 µM Forward Primer</b>	0.4 µL	400 nM
<b>10 µM Reverse Primer</b>	0.4 µL	400 nM
<b>Reverse Transcriptase</b>	0.1 µL	-
<b>RiboSafe RNase Inhibitor</b>	0.2 µL	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.9 µL	
<b>RNA</b>	2 µL	100 ng
<b>Volumen final</b>	10 µL Volumen final	

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en fibroblastos CCD-112Sk y HHSC-N.**

Gen	Gene ID	Secuencias	Referencia
<b>TGFB1</b>	NM_000660.7	F: CACTCCCTCTCTCCCTCT R: AGTGCCCAAGGTGCTCAATA	(García-Topete et al., 2024)
<b>COL1A1</b>	NM_000088.4	F: GCCTCAAGGTATTGCTGGAC R: ACCTTGTTTGCCAGGTTTCCAC	(Ploeger et al., 2013)
<b>PDGFRB</b>	Gene ID: 5159	F: GCCCTTATGTCGGAGCTGAAGA R: GTTGCGGTGCAGGTAGTCCA	(Zheng et al., 2020)
<b>TIMP1</b>	Gene ID: 7076	F: TGTTGTTGCTGTGGCTGATAGC R: TCTGGTGTCACGAACTT	(D. Zheng et al., 2020)
<b>ACTA2</b>	NM_001100.4	F: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT R: TCATGATGCTGTTGTAGGTGGT	(Ploeger et al., 2013)
<b>HPRT1</b>	NM_000194.2	F: TGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA R: TTCAAATCCAACAAAGTCTGGCT	(Zarybnicky et al., 2019)

## 2.9 Análisis estadístico

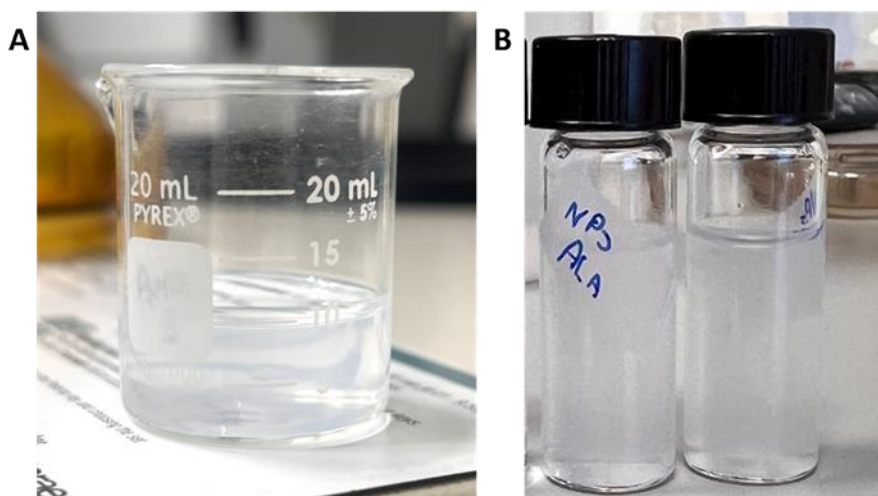
Los datos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 8. El análisis de resultados fue por medio de análisis de distribución T student o análisis de distribución de varianza (ANOVA) de una o dos vías con comparación múltiple Dunnet. Las condiciones fueron evaluadas por triplicado o duplicado (n=3 o n=2). Las diferencias entre resultados se consideran estadísticamente significativos con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Síntesis de nanopartículas híbridas

La síntesis de nanopartículas híbridas se mantuvo a una temperatura de 65 °C. Este valor de temperatura se eligió, ya que temperaturas más bajas propiciaban la formación de aglomerados y precipitados en la síntesis, conduciendo a la generación de micropartículas. En la Figura 7 podemos observar suspensiones con un grado de turbidez, sin embargo, no se observa la presencia de precipitados o aglomerados para las nanopartículas recién sintetizadas y aquellas almacenadas a 4°C durante 30 días (Figura 7B), indicando que las nanopartículas bajo estas condiciones son estables.



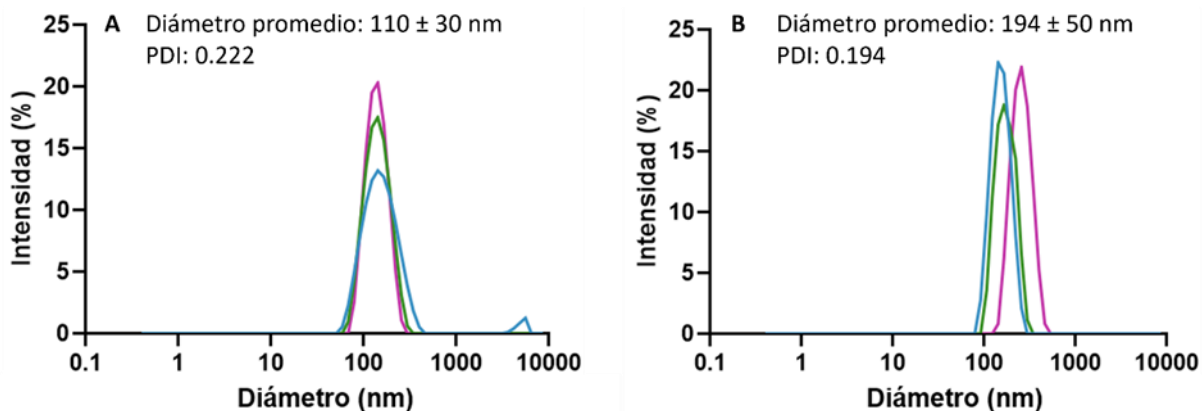
**Figura 7. Suspensiones de nanopartículas.** (A) Suspensión de nanopartículas recién sintetizadas, (B) Suspensión de nanopartículas almacenadas durante 30 días a 4°C.

### 3.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas híbridas

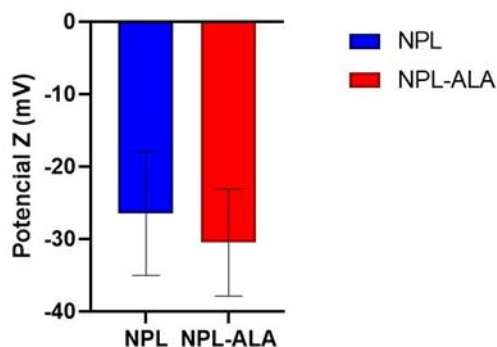
#### 3.2.1 Diámetro hidrodinámico y carga superficial

Mediante el análisis por DLS se obtuvo el tamaño promedio de las nanopartículas híbridas vacías, mostrando un tamaño promedio de  $110 \pm 30$  nm, un PDI de 0.222 y un potencial Z de -26.5 mV. En contraste, las nanopartículas cargadas obtuvieron una carga superficial y tamaño superior, dándonos

como resultado  $194 \pm 50$  nm, un PDI de 0.194 y un potencial Z de -30.5 mV (Figura 8 y 9). Por lo tanto, la incorporación del ALA mostró un efecto en el tamaño y carga superficial de las nanopartículas híbridas.



**Figura 8. Diámetro Hidrodinámico de nanopartículas híbridas mediante DLS.** (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. PDI: Índice de polidispersidad. La incorporación de ALA aumento el tamaño promedio de la nanopartícula.

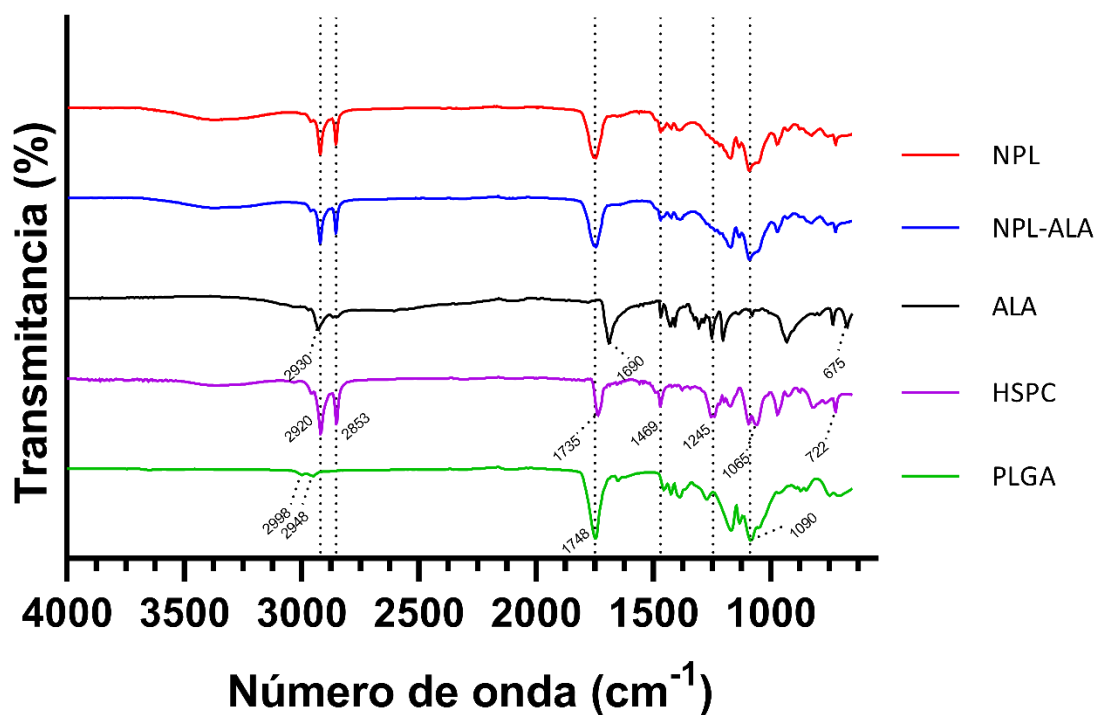


**Figura 9. Carga superficial de nanopartículas híbridas mediante potencial Z.** (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. La incorporación de ALA, aumento la carga negativa de la partícula. Las barras negras representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo.

### 3.2.2 Identificación del recubrimiento con HSPC mediante FTIR-ATR

Se llevó a cabo un análisis superficial de las NPL y NPL-ALA para confirmar el recubrimiento con lecitina de soya (HSPC) (Figura 10). La verificación se realizó analizando los materiales precursores de la síntesis: PLGA, HSPC y ALA. El espectro de transmitancia de PLGA mostró dos picos característicos a  $2948$  y  $2998$   $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración de estiramiento de C-H y C-H<sub>2</sub>. Además, se identificó un pico a  $1748$   $\text{cm}^{-1}$  relacionado al grupo carbonilo C=O, y la señal en  $1090$   $\text{cm}^{-1}$  nos indica la presencia del estiramiento C-O. En cuanto a la lecitina de soya (HSPC), se observan dos vibraciones muy altas de tensión en  $2920$  y  $2853$

$\text{cm}^{-1}$ , mientras que en 1469 se encuentra la vibración de flexión pertenecientes a la interacción C-H. Para el grupo funcional C=O, se detectó su vibración en  $1735 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que los grupos P=O y C-N los podemos encontrar en  $1245$  y  $1065 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Por último, el ALA presentó su estiramiento del grupo carbonilo C=O en  $1690 \text{ cm}^{-1}$ , un pico a  $2930 \text{ cm}^{-1}$  atribuido al estiramiento del C-H, y una vibración a  $675 \text{ cm}^{-1}$  relacionada a la interacción C-S. Después de analizar los espectros de las NPL y NPL-ALA, se observa la presencia de los picos característicos de la lecitina a  $2920$ ,  $2853$  y  $1469 \text{ cm}^{-1}$ , confirmando la presencia de HSPC en nuestro material sintetizado. Además, se detectó un desplazamiento del grupo C=O en  $1748 \text{ cm}^{-1}$  y un triplete de vibraciones en la región de  $1400\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$  por las vibraciones de rotación en el grupo C=O pertenecientes al PLGA.

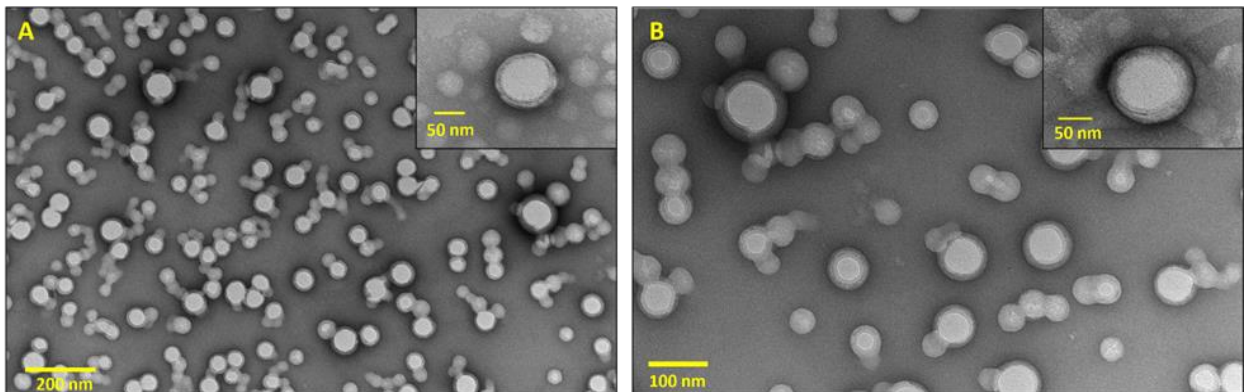


**Figura 10. Comprobación mediante FTIR del recubrimiento con HSPC de las nanopartículas híbridas.** NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El espectro FTIR de las NPL-ALA muestran los picos característicos metil atribuidos al recubrimiento con HSPC.

### 3.2.3 Morfología y tamaño

En las imágenes proporcionadas por TEM podemos apreciar las nanopartículas vacías (NPL) con una morfología esférica. Alrededor de ellas, se observa un recubrimiento en forma de corona compuesto por HSPC, con un tamaño promedio de partícula de  $60 \pm 11 \text{ nm}$ . Por otra parte, las nanopartículas cargadas

con ALA (NPL-ALA) muestran un tamaño mayor, con un promedio de  $100 \pm 15$  nm, y no presentan diferencias morfológicas con las NPL (Figura 11).



**Figura 11. Tamaño y morfología de nanopartículas híbridas obtenidas mediante TEM.** (A) NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, (B) NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con ALA. Las nanopartículas muestran una estructura núcleo (PLGA)/coraza (HSPC).

### 3.3 Evaluación del efecto de las nanopartículas en fibroblastos dérmicos humanos CCD-1112Sk

#### 3.3.1 Pruebas preliminares de viabilidad celular mediante MTT

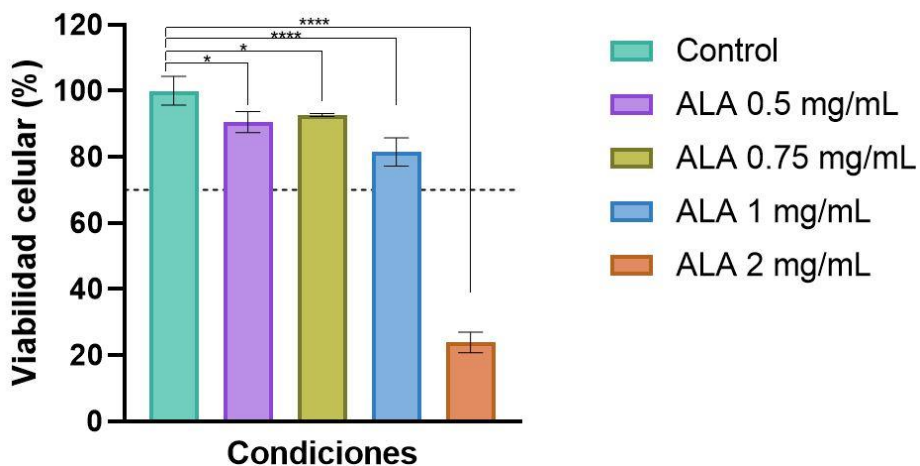
Se realizaron pruebas en fibroblastos dérmicos humanos para establecer las concentraciones adecuadas de las muestras a evaluar en los posteriores ensayos celulares. De acuerdo con la organización internacional de normalización (ISO 10993-5) sobre pruebas de citotoxicidad *in vitro*, se considera citotóxico cualquier material que disminuya la viabilidad por debajo del 70 % mediante el ensayo colorimétrico MTT.

En la Figura 12, se presenta el ensayo de viabilidad celular con distintas concentraciones de ácido alfa lipoico, el cual fue disuelto en etanol y emulsificado con kolliphor para su distribución homogénea en el medio acuoso. En este ensayo se observa que las concentraciones inferiores a 5 mM presentan una citocompatibilidad superior al 80 % lo que se considera adecuada para posteriores ensayos celulares.

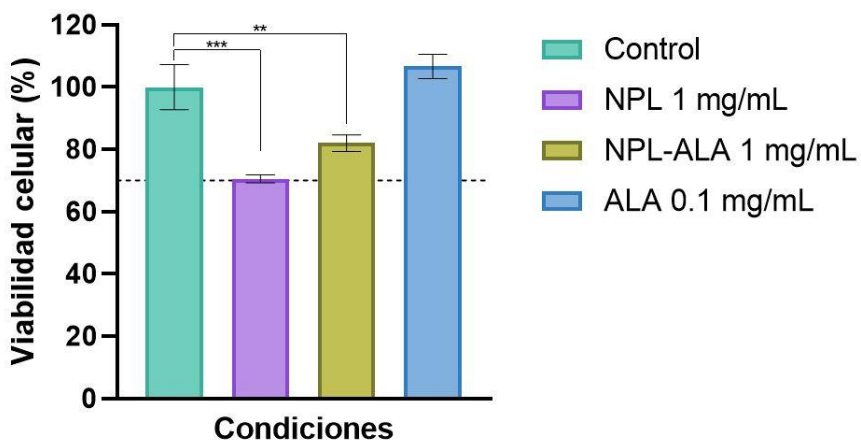
Por otro lado, en la Figura 13, las nanopartículas vacías (NPL) y cargadas (NPL-ALA) fueron probadas a una concentración de 1 mg/mL, mostrando una viabilidad  $\geq 70$  % tras 24 h de exposición. Debido a estos



resultados, se decidió utilizar está concentración en ensayos posteriores.



**Figura 12. Viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de ALA.** Control: fibroblastos humanos CCD-1112Sk intactos, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA es citocompatible en concentraciones hasta 5mM, obteniendo una viabilidad celular por encima del 80 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.05$  (\*), y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).



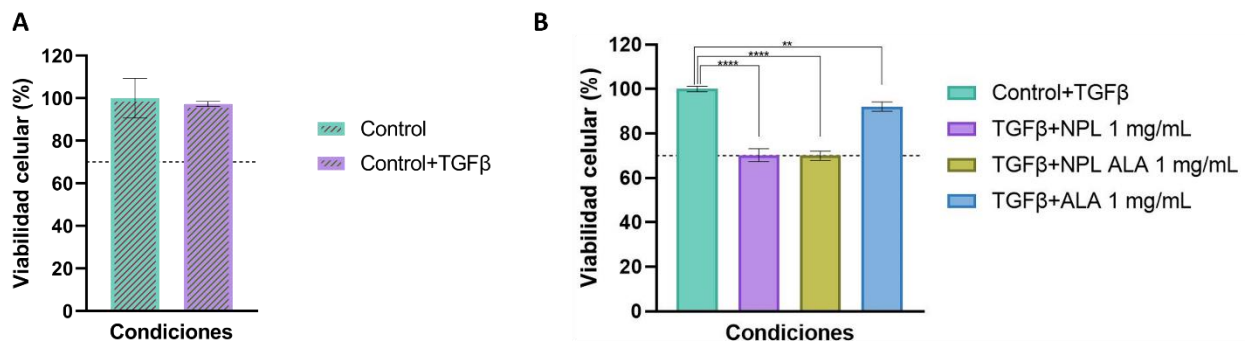
**Figura 13. Efecto en la viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk a las 24 h de exposición con diversos tratamientos.** Control: fibroblastos humanos CCD-1112Sk sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). De acuerdo con lo establecido a la norma ISO 10993-5 las NPL y NPL-ALA son citocompatibles. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*) y  $0.001$  (\*\*\*) con respecto a la muestra control.

### 3.3.2 Evaluación de NPL y NPL-ALA en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGFβ1

Después de evaluar los tratamientos en la línea celular CCD-1112Sk, se realizó una estimulación por 24 h con TGFβ1 a fibroblastos dérmicos humanos (CCD-1112Sk) para observar un efecto similar en la expresión de genes profibróticos como en células estrelladas hepáticas durante la esteatohepatitis no alcohólica. Esto permitió obtener datos preliminares del efecto por parte del ácido alfa lipoico en la expresión de genes profibróticos.

#### 3.3.2.1 Evaluación de NPL-ALA en la viabilidad celular mediante MTT

El ensayo de viabilidad celular presentado en la Figura 14B muestra que todos nuestros tratamientos mantuvieron la actividad metabólica mayor o igual al 70 %, si bien, existen diferencias significativas con el control, todos los tratamientos se consideran aptos al no considerarse citotóxicos de acuerdo con la ISO 10993-5. Además, se realizó un control con células no estimuladas (Figura 14A), donde la estimulación de los fibroblastos con 10 ng/mL de TGFβ no redujo estadísticamente la citocompatibilidad de las células.

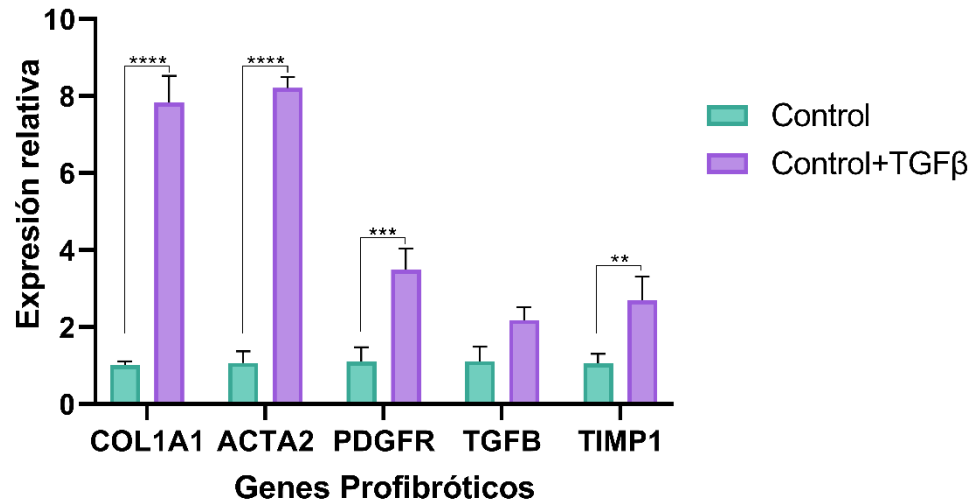


**Figura 14. Efecto en la viabilidad celular evaluada por MTT en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGFβ a las 24 h de exposición a diversos tratamientos.** Control: células sin tratamiento, Control+TGFβ: fibroblastos humanos CCD-1112Sk estimulados con TGFβ a 10 ng/mL, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L-α-fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) La estimulación con TGFβ mostro no tener un efecto negativo en la viabilidad. (B) Los tratamientos evaluados mostraron ser citocompatibles de acuerdo con la ISO 10993-5. Las barras verticales representan la desviación estándar (±), n=3 por grupo. (A) T de Student con p<0.05 y (B) Anova de una vía con p<0.05, donde un valor de 0.12 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*) y <0.0001 (\*\*\*\*).

#### 3.3.2.2 Efecto de la estimulación con TGFβ en los niveles de expresión de genes profibróticos

Se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para cuantificar la expresión de genes profibróticos, como COL1A1, ACTA2, PDGFR, TGFβ y TIMP1 en fibroblastos CCD-1112Sk

y fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con 10 ng/mL de TGF $\beta$  (Figura 15). Los resultados muestran diferencias significativas, dando un aumento de hasta 3 veces en los niveles de expresión de genes de PDGFR y TIMP, mientras que para ACTA2 y COL1A1 muestra un aumento de hasta 7 veces debido a la estimulación con TGF $\beta$ .



**Figura 15. Efecto en la expresión de genes profibróticos en fibroblastos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$ .** Control: células sin tratamiento, Control+TGF $\beta$ : fibroblastos humanos CCD-1112Sk estimulados con TGF $\beta$  a 10 ng/mL. La estimulación con TGF $\beta$  tiene un efecto en el aumento en la expresión relativa de todos los genes profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

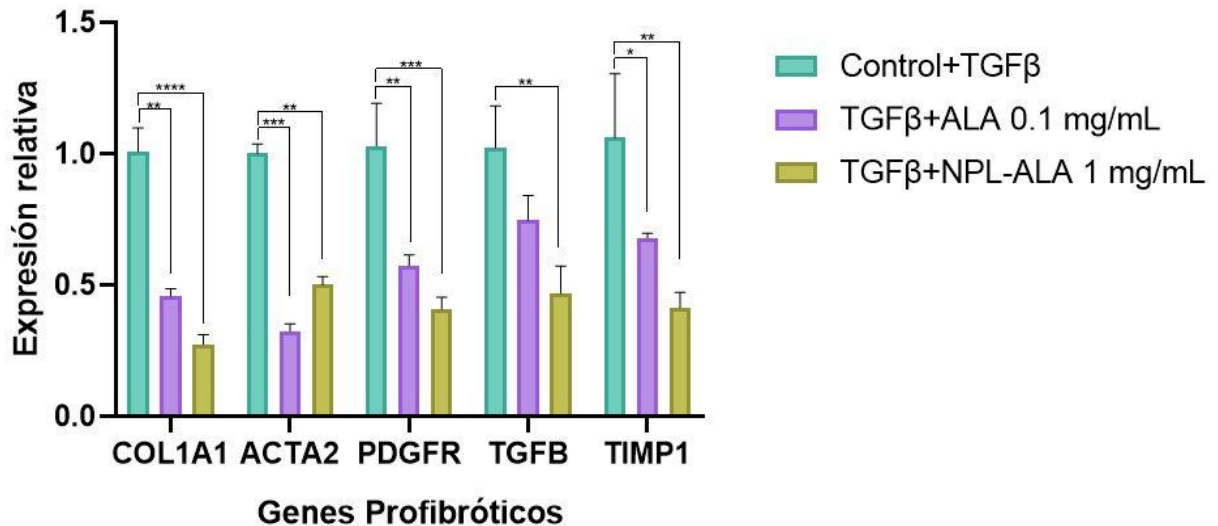
### 3.3.2.3 Efecto de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos en fibroblastos por 24 h

La evaluación con NPL-ALA y ALA y su efecto en la expresión de genes, se muestra en la Figura 16. En donde todos los tratamientos muestran una disminución significativa en la expresión de COL1A1, siendo NPL-ALA las de mayor reducción en la expresión, alcanzando una disminución del 70 %.

Los niveles de expresión de ACTA2 disminuyen hasta en un 50 % para todos los tratamientos. En cuanto a PDGFR, su expresión disminuye un 60 % con las NPL-ALA, mientras que con ALA libre, se expresa alrededor de 0.6 veces en PDGFR.

Para TGF $\beta$  se obtuvo que la mayor disminución en la expresión relativa es por NPL-ALA. Teniendo el mayor descenso y expresando 0.4 veces TGF $\beta$ . En el caso de TIMP1 todos los tratamientos tuvieron una

disminución en su expresión, mientras que NPL-ALA mostró un descenso de hasta un 60 % respecto a TIMP1.



**Figura 16. Expresión de genes profibróticos en células CCD-1112Sk estimuladas con TGFβ a las 24 h de exposición con diferentes tratamientos.** Control: Fibroblastos sin tratamiento Control+TGFβ: fibroblastos humanos CCD-1112Sk expuestos por 24 h con TGFβ a 10ng/mL, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L-α-fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las NPL-ALA muestran una disminución en la expresión relativa de todos los genes profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$  (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

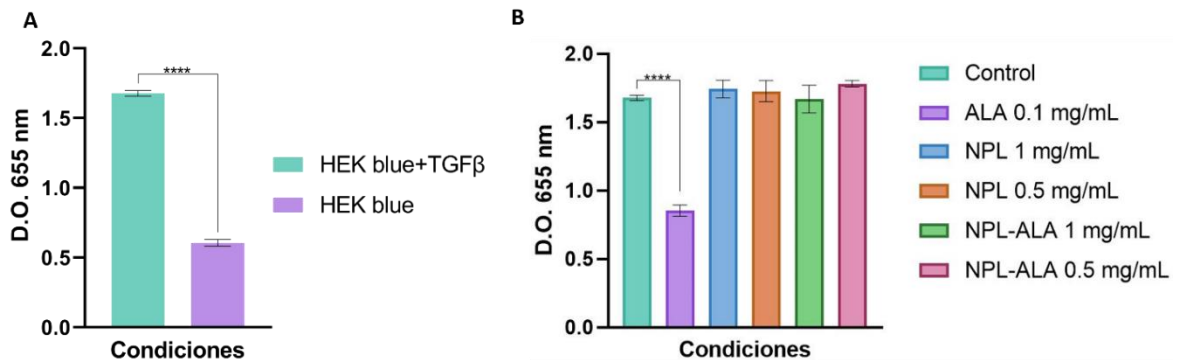
### 3.4 Evaluación de la actividad de TGFβ en células HEK-Blue TGFβ

Tras los resultados positivos en viabilidad celular y los hallazgos mediante qPCR en fibroblastos estimulados CCD-1112Sk, se decidió realizar ensayos con la línea celular HEK-Blue TGFβ. Estos ensayos determinan el efecto de los tratamientos en la intervención de la vía de señalización de TGFβ, evaluando la secreción de la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP). La elección de este ensayo se basó en la importancia de TGFβ en la progresión de enfermedades relacionadas a fibrosis.

#### 3.4.1 Efecto de NPL-ALA en la producción de SEAP

La Figura 17A muestra el efecto de las células tras estimularlas con TGFβ, permitiendo la sobreproducción de SEAP comparado con las células en estado basal. Mientras que la Figura 17B, muestra una disminución

significativa en la producción de SEAP con el tratamiento de ALA, indicando una intervención en la vía de señalización de TGF $\beta$ .



**Figura 17. Actividad de TGF $\beta$  para inducir la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) en células HEK-Blue TGF $\beta$  tratadas con diversos tratamientos.** HEK-Blue: células sin tratamiento, HEK-Blue+TGF $\beta$ : células estimuladas con 10 ng/mL por 24 h, Control: células estimuladas con 10 ng/mL por 24 h, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) Efecto en la producción de SEAP en células HEK-Blue tras estimulación con TGF $\beta$  y (B) efecto de los diferentes tratamientos en inhibir la producción de SEAP. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. (A) T de Student con  $p < 0.05$  y (B) ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 3.5 Evaluación de NPL-ALA en células estrelladas hepáticas humanas de un donador con MASH (HHSC-N)

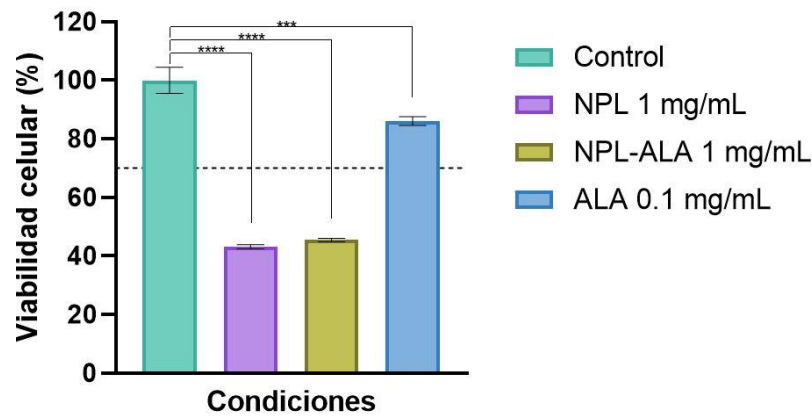
Después de haber evaluado las NPL-ALA en la viabilidad de células CCD-1112Sk por MTT, la expresión de genes en CCD-1112Sk estimuladas con TGF $\beta$  y observar el efecto en la vía de señalización de TGF $\beta$  en células HEK-Blue TGF $\beta$ , se procedió a realizar ensayos con células estrelladas hepáticas humanas de donadores con MASH (HHSC-N) tras 24 y 48 h de incubación con los tratamientos.

#### 3.5.1 Evaluación de NPL-ALA por MTT en HHSC-N por 24 h

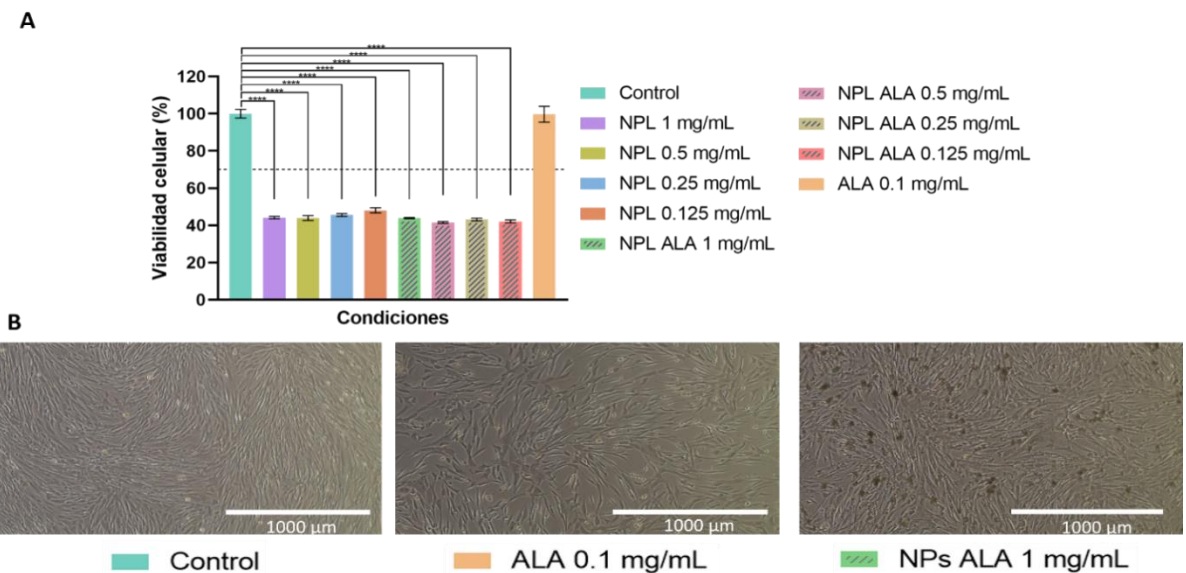
Los resultados en la Figura 18 muestra que las NPL y NPL-ALA obtuvieron una viabilidad inferior al 50 % tras 24 h (Figura 15).

Tras obtener resultados mediante MTT por debajo del 50 % en la viabilidad con las nanopartículas, se realizó nuevamente un ensayo en donde se evaluaron las NPL y NPL-ALA en un rango de 0.125 mg/mL a

1mg/mL (Figura 19A). Los resultados fueron reiterativos e indicaron una actividad metabólica por debajo del 50 % con las nanopartículas vacías y cargadas independientemente de la concentración.



**Figura 18. Viabilidad celular evaluada por MTT en células estrelladas hepáticas humanas (HHSC-N) tras 24 h de exposición a nanopartículas.** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA obtuvo una citocompatibilidad por encima del 80 %. Por otro lado, las NPL y NPL-ALA disminuyeron la viabilidad por debajo del 50 % respecto al control. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $<0.001$  (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).



**Figura 19. Viabilidad celular evaluada por MTT en células estrelladas hepáticas humanas (HHSC-N) tras 24 h de exposición a diversas concentraciones de nanopartículas.** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). (A) Observamos que independientemente de la concentración, las NPs tienen una baja citocompatibilidad sobre la línea celular HHSC-N. Por otra parte, en las fotografías (B) se observa una densidad celular del 80 % tratadas con NPL-ALA. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

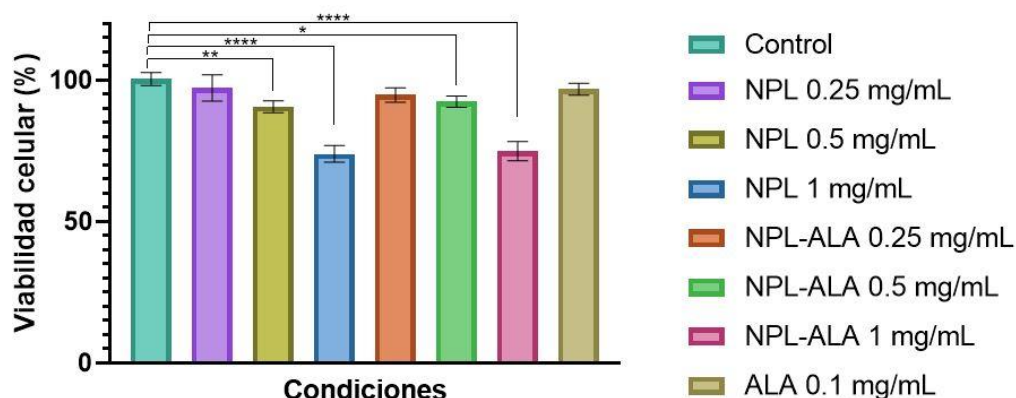
Además, se llevó a cabo un seguimiento fotográfico durante el ensayo MTT, en donde se observa una densidad celular del 80 % en la muestra de NPL-ALA, comparable con el control, lo cual no concuerda con los resultados del ensayo MTT (Figura 19B). Estos resultados sugieren que hay una interacción entre las nanopartículas híbridas y el reactivo MTT y/o sus moléculas producidas por las células, por lo tanto, se realizó una evaluación por azul de tripano.

### 3.5.2 Evaluación de NPL-ALA por azul de tripano en HHSC-N por 24 h

La evaluación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante exclusión con azul de tripano, en respuesta a los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT. Las NPL y NPL-ALA mostraron ser citocompatibles al obtener resultados positivos, siendo las NPL y NPL-ALA de 1 mg/mL con la viabilidad más baja y mostrando una buena citocompatibilidad por encima del 70 % (Figura 20).

### 3.5.3 Evaluación de citocinas proinflamatorias liberadas de HHSC-N

Se realizaron evaluaciones mediante el ensayo ELISA de citocinas liberadas por HHSC-N en los medios de cultivo tras 48 h de tratamiento. De esta manera podemos asociar los cambios en los niveles de citocinas con diversos tratamientos y compararlos con la muestra control que son células estrelladas hepáticas aisladas de una persona con la enfermedad de esteatohepatitis no alcohólica.

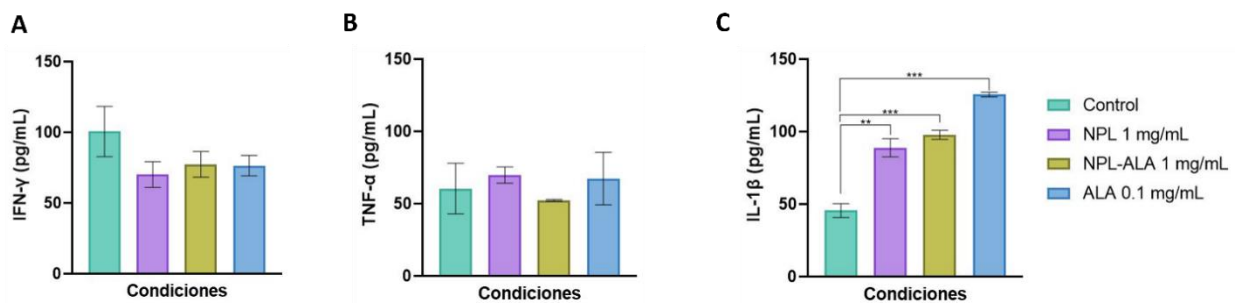


**Figura 20. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en células estrelladas hepáticas (HHSC-N) evaluado por azul tripano a las 24 h de exposición de diversos tratamientos.** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las diferentes concentraciones de NPL y NPL-ALA mostraron una citocompatibilidad por encima del 70 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).



En la figura 21A se presenta la concentración de TNF- $\alpha$  mediante el ensayo ELISA, donde no se observan diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con el análisis estadístico realizado. No obstante, se aprecia una tendencia a disminuir cuando fueron tratadas con NPL-ALA.

Para IFN- $\gamma$  en la Figura 21B, se observan una tendencia similar a TNF- $\alpha$ , teniendo una disminución en todos los tratamientos en comparación con el control. Sin embargo, tras realizar un análisis estadístico estos no son considerados distintos. Finalmente, al evaluar IL-1 $\beta$ , se detectó que nuestra muestra control presenta valores de 48 pg/mL, los cuales aumentan hasta 90 pg/mL al estar en presencia de NPL y NPL-ALA. Además, también se presentó un aumento en presencia de ALA, alcanzando concentraciones de hasta 120 pg/mL.



**Figura 21. Análisis ELISA de la liberación de citocinas en células estrelladas hepáticas (HHSC-N). (A) ELISA de TNF- $\alpha$ , (B) ELISA de IFN- $\gamma$ , (C) e IL-1 $\beta$ .** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Ningún tratamiento tuvo diferencias significativas en la concentración de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Además, se aprecian aumentos en la expresión de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con NPL, NPL-ALA y ALA. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ( $\pm$ ), n=2 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns),  $< 0.01$  (\*\*) y  $< 0.001$  (\*\*\*).

### 3.5.4 Efecto de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos en HHSC-N por 24 h

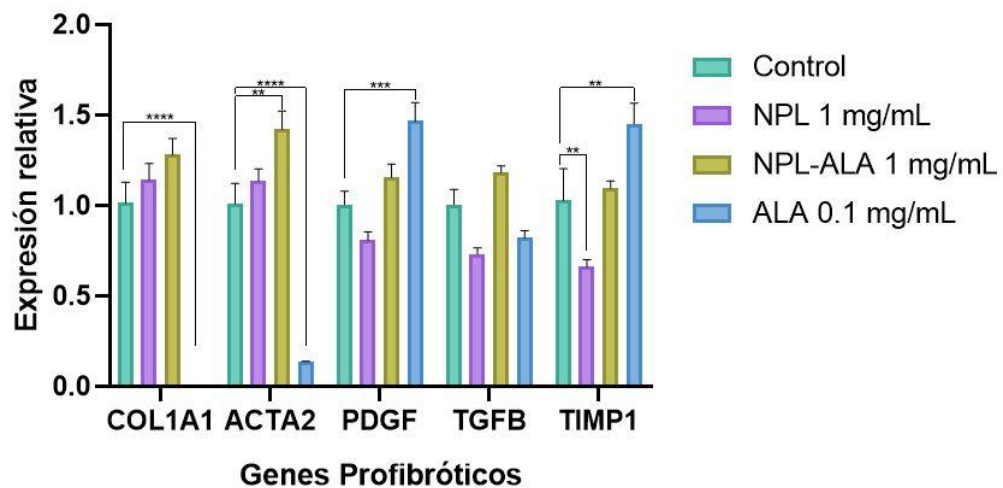
Las nanopartículas se evaluaron durante 24 h para verificar su efecto en la expresión de genes profibróticos, el análisis estadístico mostró que la mayoría de la expresión en los genes evaluados no fue alterada por los tratamientos (Figura 22).

En el gen COL1A1 los niveles se mantuvieron cercanos al control sin diferencias significativas para los tratamientos con NPL y NPL-ALA. Sin embargo, el ALA obtuvo una disminución en la expresión relativa hasta 0.02 con respecto a la muestra control. Para ACTA2 se observó un aumento de 1.4 veces para el tratamiento con NPL-ALA y una disminución en la expresión relativa hasta un 90 % de ACTA2 con respecto a la muestra control.



Las NPL no mostraron cambios significativos de acuerdo con la estadística realizada. En PDGF, los niveles de expresión aumentaron con el tratamientos de ALA en un 40 %, no es el caso de las NPL-ALA que se mantienen cercanos al control. Si bien, se observó que no hay diferencia significativa en la expresión relativa de PDGF con NPL, se observa una tendencia a disminuir.

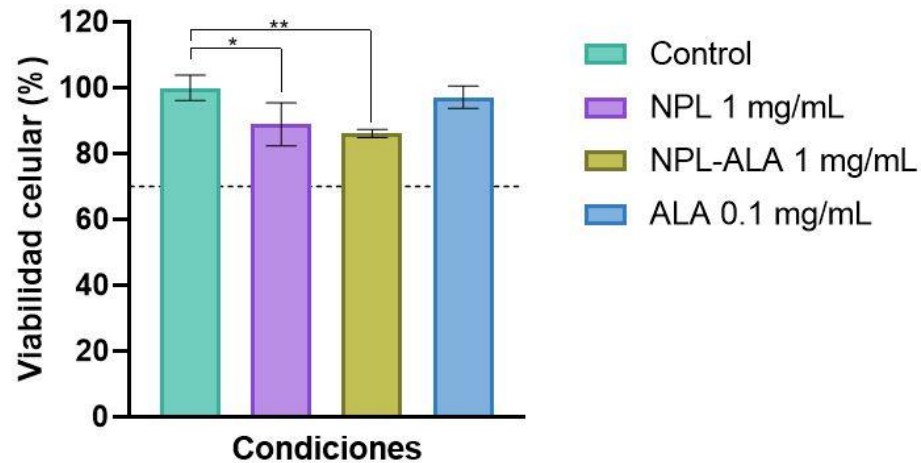
En los niveles de expresión de TGF $\beta$  no se observaron diferencias significativas, pero se notó una tendencia a disminuir con los tratamientos de nanopartículas, tanto vacías como cargadas (NPL- y NPL-ALA, respectivamente). Mientras que para TIMP1 observamos una disminución en la expresión relativa hasta un 40 % con NPL, el tratamiento con ALA aumento hasta 1.4 veces y en el caso de NPL-ALA no se observaron diferencias en los niveles de expresión relativa de TIMP1.



**Figura 22. Efecto en la expresión de genes profibróticos en HHSC tras 24 h de tratamiento.** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). El ALA y Las NPL disminuyeron la expresión relativa de genes profibróticos. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $< 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 3.5.5 Evaluación de NPL-ALA por azul de tripano en HHSC-N por 48 h

Se realizó un ensayo de exclusión por azul tripano para determinar la viabilidad tras 48 h de exposición al tratamiento. Todos los tratamientos se mantuvieron por encima del 70 % lo que nos indica una buena citocompatibilidad (Figura 23).



**Figura 23. Efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en células estrelladas hepáticas (HHSC-N) evaluado por azul tripano a las 48 h de exposición de diversos tratamientos.** Control: HHSC sin ningún tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL de ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Los tratamientos evaluados mostraron una citocompatibilidad superior al 80 %. Las barras verticales representan la desviación estándar ( $\pm$ ), n=3 por grupo. ANOVA de una vía con comparación múltiple Dunnett con  $p < 0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*) y 0.01 (\*\*).

### 3.5.6 Evaluación de NPL-ALA en la expresión de genes profibróticos por 48 h

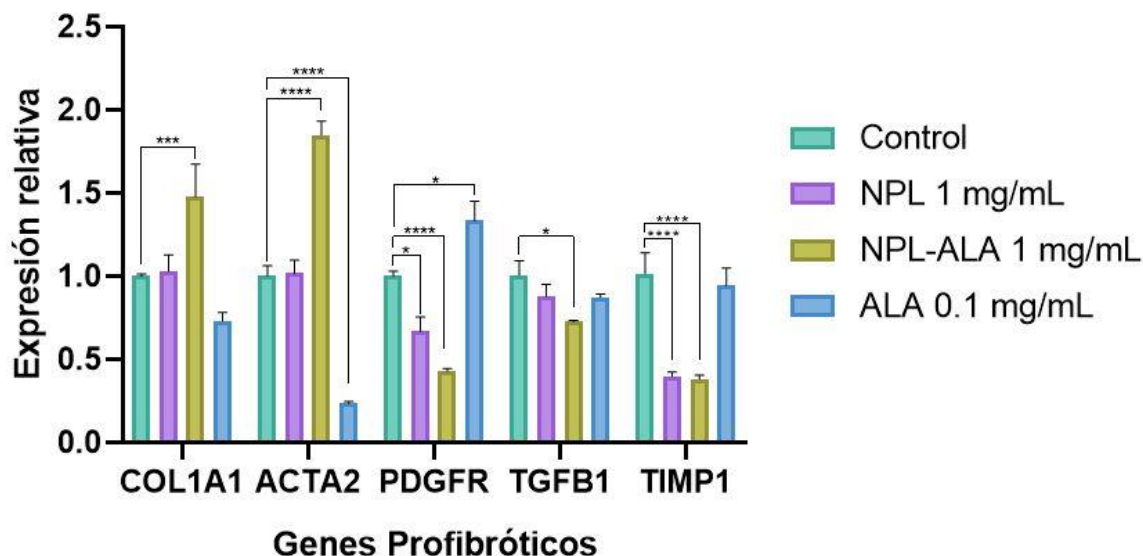
La evaluación de expresión de genes tras 48 h de tratamiento muestra que las NPL y NPL-ALA reducen la expresión de PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP, mientras que los genes COL1A1 Y ACTA2 se ven disminuidos por los tratamientos con ALA (Figura 24).

Para COL1A1, se observó una disminución en la expresión relativa con ALA de un 25 %. No es el caso con las NPL-ALA, que mostraron un aumento en la expresión de 1.5 veces. Mientras que las NPL, no presentaron cambios en los niveles de expresión con respecto al control.

La expresión de ACTA2 disminuyó en un 75 % al estar con el tratamiento de ALA, mientras que las NPL-ALA tuvieron un aumento del 70 %. Por otro lado, las NPL no mostraron cambios significativos en los niveles de expresión.

Para el gen PDGF, se obtuvo una disminución de un 35 y 50 % en la expresión relativa al ser tratado con NPL y NPL-ALA respectivamente. Mientras que ALA mostró una tendencia a aumentar la expresión en 1.3 veces. Pasando a TGF $\beta$ , los tratamientos con NPL, NPL-ALA y ALA tuvieron una tendencia a disminuir la expresión relativa, no obstante, el análisis estadístico no presenta diferencias significativas. Finalmente, la expresión relativa de TIMP1, obtuvo una disminución con las NPL y NPL-ALA de un 55 % para ambos

tratamientos. Mientras que para la muestra tratada con ALA, no lograron diferencias significativas con respecto a la muestra control.



**Figura 24. Efecto en la expresión de genes profibróticos en HHSC tras 48 h de tratamiento.** Control: HHSC-N sin tratamiento, NPL: Nanopartículas PLGA-HSPC vacías, NPL-ALA: nanopartículas PLGA-HSPC cargadas con 0.1 mg/mL ALA, ALA: ácido alfa lipoico, HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, PLGA: ácido poli (láctico-co-glicólico). Las NPL-ALA tuvieron una disminución en la expresión relativa de PDGFR y TIMP. Las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$ ),  $n=3$  por grupo. ANOVA de dos vías con comparación múltiple Dunnet con  $p<0.05$ , donde un valor de 0.1 es considerado no significativo (ns), 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) y  $<0.0001$  (\*\*\*\*).

## Capítulo 4. Discusión

---

Las nanopartículas híbridas NPL-ALA diseñadas para este proyecto contienen un núcleo polimérico de PLGA, un co-polímero anfifílico capaz de formar una matriz para encapsular compuestos hidrofílicos y lipofílicos, protegiéndolos de la degradación y mejorando su biodisponibilidad (Cohen-Sela et al., 2009; Feltrin et al., 2022). La lecitina de soya (HSPC) forma una capa alrededor de la nanopartícula, permitiendo una mayor estabilidad y una liberación sostenida del compuesto encapsulado (Fang et al., 2010; O'Neill et al., 2017). Mientras que el ALA es un compuesto capaz de reducir el estrés oxidativo y la producción de citocinas involucradas en la progresión de enfermedades crónico-degenerativas como diabetes y fibrosis (Longhitano et al., 2024; Tibullo et al., 2017). La síntesis de las NPL-ALA se realizó mediante nanoprecipitación y autoensamblaje, también conocido como desplazamiento de disolvente (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Este método consiste en la incorporación gota a gota de una fase orgánica con PLGA y el compuesto a encapsular en una fase acuosa a 65 °C para obtener una buena disolución de HSPC (Chan et al., 2009). Durante este proceso, es importante asegurar que la estabilidad térmica del ALA no se vea comprometida al llevar a cabo la reacción a 65 °C. Los estudios indican que el ALA se descompone térmicamente por encima de los 130 °C (Silva et al., 2016) por lo tanto dado que la reacción sucedió a 65 °C, la probabilidad de la descomposición del ALA es prácticamente nula. Posteriormente, en la etapa de autoensamblaje de las nanopartículas, se aplicó energía mediante sonicación, lo que permitió la formación de las nanopartículas híbridas (Ahmaditabar et al., 2017; Fang et al., 2010).

Tras obtener las NPL (vacías) y NPL-ALA (cargadas con ALA), se llevó a cabo una caracterización de las propiedades fisicoquímicas para determinar su composición y naturaleza, así como la liberación del ALA para evaluar el potencial efecto que tendría al regular la expresión de genes profibróticos en un modelo *in vitro* de HHSC de un paciente con MASH. La espectroscopía por dispersión de luz dinámica es una técnica que permite medir el tamaño aproximado de la nanopartícula, potencial Z y distribución de tamaño de moléculas y partículas en suspensión, también conocido como índice de polidispersidad (PDI). La técnica se basa en el movimiento browniano de las partículas donde partículas pequeñas se muevan más rápido que las de mayor tamaño, de esta forma la luz del láser se dispersa en diferentes intensidades y genera fluctuaciones que son el resultado de la velocidad de las moléculas (Prouenchev, 1979; Raval et al., 2018). El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas vacías es de 110 nm, un PDI de 0.222 y un potencial Z de -26.5 mV. En contraste las nanopartículas cargadas mostraron un aumento en el diámetro hidrodinámico, alcanzando 194 nm, con un PDI de 0.194 y un potencial Z de -30.5 mV. Este bajo PDI, por debajo de 0.3 se considera aceptable en aplicaciones de administración de fármacos e indica una población homogénea,

mientras que la guía para la industria de la FDA en productos farmacéuticos nos menciona la importancia de la distribución de tamaño como un punto crítico de calidad (Danaei et al., 2018; Zhang & Wang, 2023). Por otro lado, el potencial Z refleja la carga superficial de las partículas en suspensión y determina su estabilidad. En donde un potencial Z más cercano a cero, indica una mayor posibilidad de agregación debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals, mientras que valores más altos, por encima de  $\pm 25$  mV, tendrán una buena estabilidad y evitan aglomeraciones (Honary & Zahir, 2013). De acuerdo con nuestros resultados, obtuvimos nanopartículas estables ya que NPL y NPL-ALA se encuentran por encima de -25 mV y la incorporación del ALA no alteró la estructura del material, manteniendo el potencial Z en ambas nanopartículas. Finalmente, el tamaño de NPL-ALA mostró un aumento en comparación con las NPL. Este efecto ha sido reportado con diferentes compuestos, donde la incorporación de un fármaco a encapsular resulta en un aumento del tamaño de las nanopartículas (Budhian et al., 2007; Wan et al., 2018b).

El microscopio electrónico de transmisión desempeña un papel fundamental en la caracterización de materiales al proporcionar una alta amplificación y resolución que permite revelar la microestructura de los materiales. En el análisis por TEM, un haz de electrones es transmitido hacia la superficie de la muestra y colectado en una pantalla especializada para obtener una micrografía (Egerton, 2005). Este análisis nos permitió observar que tras la incorporación de ALA en las nanopartículas, las NPL tuvieron un aumento en el tamaño, pasando de 60 a 100 nm, lo cual es común al incorporar o aumentar la carga de un compuesto bioactivo. Este tamaño es adecuado, ya que se ha reportado que tamaños entre 20-150 nm tienden a una mayor acumulación en hígado y bazo, lo que permitiría a nuestras nanopartículas una orientación pasiva hacia el tejido diana (Dolai et al., 2021). Además, en las micrografías se observó la formación de nanopartículas esféricas y la presencia de dos materiales debido al contraste realizado con una tinción del material, mostrándonos una monocapa lipídica compuesta por HSPC. Dado que HSPC es una molécula anfifílica, permite que la cabeza polar de fosfato se oriente hacia el exterior y que las colas de ácidos grasos se orienten hacia dentro, interactuando con el PLGA mediante interacciones hidrofóbicas (Varghese et al., 2016).

La técnica FTIR-ATR es una técnica superficial no destructiva que nos permite identificar los grupos funcionales presentes en las muestras. Consiste en dirigir un haz de radiación infrarroja hacia a un cristal con un alto índice de refracción, lo que resulta en una reflexión interna total. Esta reflectancia genera una onda que se extiende desde la superficie del cristal hacia la muestra en análisis. La onda evanescente se atenuará en donde la muestra absorba energía y el haz atenuado regresa al cristal, dirigiéndose al detector del equipo y formando un espectro de infrarrojo que nos permite identificar qué tipo de grupos

funcionales están presentes (Mcmurry, 2008; ThermoFisher, s.f.). El análisis por FTIR-ATR revela dos vibraciones de estiramiento a 2,920 y 2,853  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a enlaces C-H que pertenecen a HSPC. Aunque el PLGA contiene dos vibraciones en esa región, la intensidad de sus picos es más débil para ser atribuidos a este. Esto sugiere la formación de la capa lipídica en la superficie de las NPL y NPL-ALA. Por otro lado, no se detectó la presencia del grupo sulfhídrico del ALA, lo que sugiere que se encuentra en el interior de la nanopartícula.

Para determinar las concentraciones citocompatibles de ALA, NPL vacías y cargadas se realizaron ensayos preliminares de viabilidad en la línea celular CCD-1112Sk (fibroblastos) a través del ensayo de viabilidad celular mediante el reactivo MTT. En este ensayo, se mide la actividad mitocondrial a través de la conversión de la sal amarilla MTT en cristales de formazán por las enzimas oxidoreductasas mitocondriales en células metabólicamente activas, formando cristales púrpura oscuro. Dado que los cristales de formazán son insolubles en agua, se utilizó una solución para solubilizarlos y se cuantificó la viabilidad midiendo la absorbancia a 570 nm. Una mayor intensidad en la coloración indicó mayor cantidad de células viables (Mosmann, 1983). En la evaluación del ALA libre en concentraciones de 0.5 a 1 mg/mL (2.5 a 5 mM) como las nanopartículas vacías y cargadas a 1 mg/mL obtuvieron una viabilidad superior al 70 % que de acuerdo con lo establecido en la ISO-10993-5 "Evaluación biológica de dispositivos médicos, Ensayos de citotoxicidad", no se considera citotóxico. Estos resultados coinciden con diversos estudios del ALA libre en concentraciones de 0.1 a 3 mM en donde no se ha mostrado un efecto citotóxico en células estrelladas hepáticas (LX-2) y en la línea celular CRL-4023 (An et al., 2021). Por otro lado el tratamiento con nanopartículas híbridas de PLGA/lecitina de soya se han evaluado en células L929 de ratón y HeLa en un rango de 0.1 a 25 mg/mL y se obtuvieron una viabilidad superior al 80 % en concentraciones inferiores a 1.5 mg/mL (Ahmaditabar et al., 2017; Chan et al., 2009). Por lo tanto, las concentraciones evaluadas no son consideradas citotóxicas para las células CCD-1112Sk bajo las condiciones evaluadas de ALA (0.5-5 mM) y NPL cargadas y vacías (1mg/mL).

Durante las enfermedades crónicas en el hígado, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) es un inductor clave de la activación de las células estrelladas hepáticas y fibroblastos a miofibroblastos, expresando un estado continuo de genes profibroticos (Desmoulibre et al., 1993.; Tsuchida & Friedman, 2017). Por lo tanto, se implementó un modelo profibrótico utilizando la línea celular CCD-1112Sk (fibroblastos) estimulada con TGF para evaluar el efecto de las NPL-ALA y ALA en la regulación de genes profibróticos mediante mediante qPCR. Primero se evaluó el aumento en la expresión de genes en células en estado basal y células estimuladas con 10 ng/mL de TGF $\beta$  por 24 h, tras la estimulación con TGF $\beta$  hubo un incremento en la expresión de 782, 820, 348, 217 y 269 % de COL1A1 y ACTA2, PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP1

respectivamente. Una vez confirmado el aumento en la expresión de genes profibróticos en células estimuladas con TGF $\beta$ , evaluamos el efecto con ALA y NPL-ALA en la regulación de los genes asociados con la fibrosis en los fibroblastos estimulados con TGF-beta. Los resultados mostraron que al tratar las células con NPL-ALA tuvieron una disminución en la expresión de genes profibróticos del 73, 60, 54 y 59 % en COL1A1, PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP1, respectivamente. Mientras que el ALA obtuvo una disminución del 55, 43, 26 y 37 % para los mismos genes evaluados. Si bien el ALA obtuvo resultados esperados, las nanopartículas mostraron un mayor efecto al disminuir la expresión de los genes evaluados.

Debido a los resultados prometedores en la expresión de genes profibróticos y la importancia de TGF $\beta$  en la activación de las HSC, decidimos evaluar el potencial efecto de las NPL-ALA y ALA en la vía de señalización de TGF $\beta$ . Para ello, se realizó un ensayo con la línea celular HEK-Blue TGF $\beta$  que a través de la proteína reportera fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) nos permitirá correlacionarla con la vía de señalización de TGF $\beta$ . Estas células fueron diseñadas a partir de la línea celular HEK 293 para detectar TGF $\beta$  humano mediante la activación de la vía TGF $\beta$ /Smad, las células al activar dicha vía expresan SEAP. La estimulación de las células con TGF $\beta$  desencadena una cascada de señalización que permite la formación del complejo Smad3/Smad4 y una vez que entra este heterocomplejo al núcleo se une a los sitios SBE que son factores de transcripción e inducen la producción de SEAP. SEAP puede ser evaluado mediante la solución QUANTI-Blue, un ensayo enzimático colorimétrico que se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro a 640 nm. Los resultados obtenidos en este ensayo nos muestran que el ALA a 0.1 mg/mL (0.5 mM) logró reducir significativamente los niveles de SEAP ( $p < 0.001$ ) y con ello una disminución en la vía de señalización de TGF $\beta$  mediada por Smad 3/4. Estos resultados son coincidentes con lo reportado en trabajos anteriores, en donde se ha visto que el ALA tiene la capacidad de intervenir en la vía de señalización de las Smad, dando lugar a la inhibición de la proteína Smad3 fosforilada, lo que no permite la formación del heterocomplejo smad3/4 (Liu et al., 2019; Min et al., 2010). Si bien el ALA tuvo un efecto en la vía en Smad, no hubo efecto del ALA cargado en las nanopartículas, hasta el momento no encontramos reportes en dónde se dé una explicación en la interferencia de este tipo de nanopartículas dado que si hubo un efecto en los genes profibróticos y no se afectó la viabilidad celular, los resultados sugieren que la nanopartícula tiene un efecto en la regulación de genes profibróticos que no está asociado a esta ruta de Smad 3/4.

Una vez realizadas las pruebas preliminares en el modelo de fibrosis inducida por TGF $\beta$  en fibroblastos, se procedió a realizar los ensayos con las células estrelladas hepáticas humanas. Las células estrelladas hepáticas a pesar de ser unas de las células en menor cantidad cuando el hígado está sano, son un factor clave en la progresión de la fibrosis en enfermedades hepáticas como MASH expresan una alta cantidad

de citocinas y genes relacionadas a un estado activo o transdiferenciado que permite la progresión de la fibrosis (Hammerich & Tacke, 2023; Park et al., 2016). Las células evaluadas son provenientes de una persona diagnosticada en fase 3 con la enfermedad de MASH (Células HHSC-N, IXcells Biotechnology). Para comenzar, se evaluó la citocompatibilidad en las células HHSC-N a las NPL y NPL-ALA a 1 mg/mL, en donde se muestra una viabilidad inferior al 50 %, estos resultados no fueron los esperados ya que previamente las nanopartículas a esta concentración fueron citocompatibles con fibroblastos CCD1112Sk por lo que se procedió a realizar evaluaciones de NPL y NPL-ALA en un rango de 0.125 a 1 mg/mL por MTT. Todas las concentraciones de NPL y NPL-ALA obtuvieron una viabilidad del 50 % nuevamente, sin embargo este resultado no coincidía con el seguimiento fotográfico mediante microscopia en donde se observó una confluencia y una morfología de células mayor a las tratadas con ALA libre y comparable al control, esto indicó que probablemente haya una interacción entre las nanopartículas y las HHSC-N, porque estas mismas nanopartículas no fueron citotóxicas para los fibroblastos CCD-1112Sk. Dado que la citocompatibilidad de las HHSC-N es importante para su evaluación mediante expresión de genes y citocinas profibróticas, y al obtener los resultados contradictorios por MTT y las fotografías, se realizó una prueba de citocompatibilidad mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano que es utilizado para determinar la cantidad de células viables en suspensión. El principio de este ensayo se basa en que las células viables poseen membranas celulares intactas y excluyen los tintes, mientras que las células no viables y con membranas dañadas se teñirán de azul oscuro. Este método se llevó a cabo utilizando un hematocitómetro y fue evaluado bajo un microscopio invertido, definiendo la viabilidad como el número de células viables entre el número total de células (Strober, 2015). La Figura 20 muestra que las NPL y NPL-ALA de 0.25 a 1 mg/mL lograron mantener una viabilidad superior al 70 % después de la incubación por 24 h. Las NPL-ALA no han sido evaluadas por otros autores para poder comparar con trabajos previos por otros autores nuestros resultados, sin embargo, como ya anteriormente mencionamos, el uso de NPL ha mostrado una citocompatibilidad en otras líneas celulares cuando se ha evaluado hasta 1.5 mg/mL (Ahmaditabar et al., 2017; Chan et al., 2009). Por lo tanto, estas nanopartículas no son citotóxicas para las células estrelladas hepáticas bajo las condiciones evaluadas según la norma ISO 10993-5.

Una vez evaluada la citocompatibilidad de las HHSC-N, determinamos los niveles de proteína mediante ensayos ELISA de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo de HHSC-N para evaluar el potencial efecto de las NPL-ALA tras 48 h de incubación. El TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  son citocinas proinflamatorias relacionadas con el estado de inflamación crónica durante enfermedades como MASH (Duan et al., 2022; Weng et al., 2007). Si bien ningún tratamiento tuvo un efecto significativo en la concentración de TNF- $\alpha$ , se observa una tendencia a disminuir por parte de las NPL-ALA. Esta disminución se ha relacionado con la reducción de inhibidores de metaloproteinasas, encargadas de degradar la matriz extracelular (Beringer &



Miossec, 2019). Por otra parte observamos que los tratamientos tuvieron un efecto en la concentración de IFN- $\gamma$ , dando una reducción de 100 pg/mL a 77 pg/mL para las NPL-ALA y ALA con respecto al control. Mientras que la IL-1 $\beta$  se observa un aumento de 45.5 pg/mL en el control a 97.7 pg/mL al tratarlas con las NPL-ALA y 125.5 pg/mL con ALA. Estos resultados son favorables, ya que en un ensayo con células estrelladas hepáticas (LX2), la IL-1 $\beta$  redujo su activación mediante la disminución de expresión de  $\alpha$ -SMA o ACTA2 y aumento la expresión de metaloproteínasa de matriz (MMP) 9 (Meier et al., 2019). Estos resultados sugieren que el tratamiento con NPL-ALA tienen un efecto positivo en la traducción de proteínas que podrían ayudar a detener la progresión de la fibrosis.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis mediante expresión de genes por qPCR para evaluar el efecto de ALA (0.1 mg/mL) y las NPL y NPL-ALA (1 mg/mL) libre en la regulación de genes profibróticos. El ALA a 0.1 mg/mL tras 24 h de incubación tuvo un efecto en la disminución en la expresión de COL1A1 en un 99 % y ACTA en un 90 %. ACTA es un marcador de transdiferenciación hacia el fenotipo de células tipo miofibroblasto que son asociados a la progresión de la fibrosis al producir excesivamente matriz extracelular de colágeno y con ello su gen COL1A1 (Hammerich & Tacke, 2023). Sin embargo, el ALA a 0.1 mg/mL no tuvo diferencias significativas en la expresión de TGF $\beta$  que está asociado a la activación constante de las HHSC-N y que tiene un efecto en la producción de COLA1 y ACTA2, mientras que en diversos estudios *in vivo* se ha visto que ALA tiene un efecto en la inhibición de la expresión de TGF $\beta$  (Liu et al., 2019). Además, ALA tuvo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) respecto al control en la expresión relativa de PDGFR y TIMP1 de 46 y 45 %, respectivamente. Por otra parte, las nanopartículas a 1 mg/mL cargadas con 0.1 mg/mL de ALA tras 24 h de incubación con HHSC-N no mostraron un efecto significativo en la expresión de PDGFR, TGF $\beta$ , TIMP y COL1A1 con respecto al control, siendo ACTA2 la que obtuvo un aumento en su expresión con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Comparado con las NPL, estas si mostraron una disminución de la media en PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP1. Estos resultado los relacionamos con el tamaño de la nanopartícula, que al tener un mayor tamaño toma un mayor tiempo internalizarse en las células y causar un efecto (Nicolette et al., 2011). Por lo que se llevó a cabo una evaluación por qPCR tras 48 h de incubación de HHSC-N con los tratamientos. Si bien se repitió la misma tendencia en las NPL, en las NPL-ALA (1 mg/mL), tuvieron una disminución significativa en PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP1 en un 55, 26 y 38 %, respectivamente con respecto al control. Estos resultados son prometedores debido a que TGF $\beta$  y PDGFR están asociados a la continua activación, proliferación y supervivencia de las células estrelladas hepáticas activas (Dewidar et al., 2019; Wong et al., 1994). Mientras que la disminución de TIMP1 permitiría a las metaloproteínasas la degradación de la matriz extracelular provocada por estas células. Si bien, se obtuvo una mayor expresión de COL1A1 y ACTA2 con respecto al control a las 24 y 48 h de incubación con NPL-ALA probablemente podría atribuirse a un mayor tamaño de la partículas cargadas con respecto a las

vacías debido a que no hay diferencia significativa por lo que no podemos atribuir esta mayor expresión de COL1A1 y ACTA2 a la interacción de estas nanopartículas con las HHSC-N y el ácido alfa lipoico libre tiene una disminución en la producción de COL1A1 y ACTA2. Por el momento es la explicación presentada debido a estos resultados presentados y se necesitan estudios posteriores para evaluar estos resultados.

Nuestros resultados muestran un potencial de las NPL-ALA al lograr disminuir la expresión de genes asociados a fibrosis, así como un efecto en la producción de proteínas que permiten la inactivación de las HSC tras 48 h. Estos resultados muestran un potencial en la regulación de la progresión de fibrosis en enfermedades como MASH.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas híbridas con un núcleo de PLGA y una cubierta lipídica (HSPC) tanto para NPL como para NPL-ALA que fue confirmada mediante FTIR. Las NPL y NPL-ALA tuvieron un tamaño de  $60 \pm 11$  nm y  $100 \pm 15$  nm, respectivamente y al analizarlos mediante TEM.

Las NPL y NPL-ALA de 0.25 mg/mL a 1 mg/mL fueron citocompatibles en células estrelladas HHSC-N y fibroblastos CCD-1112Sk.

Las NPL a 1 mg/mL cargadas con 0.1 mg/mL de ALA fueron capaces de promover una disminución de 23 pg/mL en IFN- $\gamma$ , mientras que para IL-1 $\beta$  hubo un incremento de 52 pg/mL respecto al control. Por otra parte, no se obtuvieron cambios en la secreción de TNF- $\alpha$  con respecto al control.

Las NPL a 1 mg/mL cargadas con 0.1 mg/mL de ALA fueron de disminuir la expresión de genes profibróticos PDGFR, TGF $\beta$  y TIMP1 en un 55, 26 y 38 %, respectivamente en células estrelladas hepáticas de un donador con esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH). Por otro lado ALA libre no tuvo una modulación TGF $\beta$  y TIMP1, mientras que en PDGFR aumento en un 33 % con respecto al control.

### 5.1 Perspectivas

Si bien estos resultados son importantes debido al uso de células aisladas de un paciente diagnosticado con la enfermedad de MASH que nos ayudan a obtener resultados que se acercan más a la respuesta que podría tener en una persona por todo el daño multifactorial en el día a día y no inducido mediante algún agente fibrótico. En los trabajos a futuro, con la finalidad de continuar la evaluación de las nanopartículas y su efecto en las células estrelladas hepáticas, se podrían realizar ensayos con otros genes asociados a la fibrosis, incrementar el tiempo de incubación a 72 h para determinar el efecto de los tratamientos en la expresión de COL1A1 y ACTA2. Además podría trabajarse en las nanopartículas híbridas mediante diversos recubrimientos y verificar el perfil de liberación y la detección del ALA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). Por otra parte, para imitar el microambiente del hígado y enriquecer el proyecto, se podría realizar la implementación de un co-cultivo de las células estrelladas hepáticas con más tipos celulares residentes en el hígado como los hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales y ver un efecto acercado a un modelo *in vivo*.

## Literatura citada

- Ahmaditabar, P., Momtazi-Borojeni, A. A., Rezayan, A. H., Mahmoodi, M., Sahebkar, A., & Mellat, M. (2017). Enhanced entrapment and improved in vitro controlled release of N-Acetyl cysteine in hybrid PLGA/Lecithin nanoparticles prepared using a nanoprecipitation/self-assembly method. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12). <https://doi.org/10.1002/jcb.26070>
- An, X., Liu, L., Schaefer, M., Yan, B., Scholz, C., Hillmer, S., Wang, K., Luo, Y., Ji, H., Gladkich, J., & Herr, I. (2021). Alpha-lipoic acid prevents side effects of therapeutic nanosilver without compromising cytotoxicity in experimental pancreatic cancer. *Cancers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/cancers13194770>
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Beringer, A., & Miossec, P. (2019). IL-17 and TNF- $\alpha$  co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 198(1). <https://doi.org/10.1111/cei.13316>
- Bernal-Reyes, R., Icaza-Chávez, M. E., Chi-Cervera, L. A., Remes-Troch, J. M., Amieva-Balmori, M., Priego-Parra, B. A., Martínez-Vázquez, S., Méndez-Guerrero, I. O., Martínez-Rodríguez, L., Barranca-Enríquez, A., Palmeros-Exsome, C., Cano-Contreras, A. D., & Triana-Romero, A. (2023). Prevalencia y características clínico-epidemiológicas de una población mexicana con enfermedad del hígado graso asociada a una disfunción metabólica: un estudio en población abierta. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 88(3). <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.09.002>
- Brunt, E. M., Wong, V. W. S., Nobili, V., Day, C. P., Sookoian, S., Maher, J. J., Bugianesi, E., Sirlin, C. B., Neuschwander-Tetri, B. A., & Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Disease Primer* 1(15080). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>
- Budhian, A., Siegel, S. J., & Winey, K. I. (2007). Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.061>
- Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M. F., & Marchesini, G. (2010). Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16(17). <https://doi.org/10.2174/138161210791208875>
- Bugianesi, E., & Petta, S. (2022). NAFLD/NASH. In *Journal of Hepatology*, 77(2). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.02.006>
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(8). <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>
- Carrión, J. A. (2009). Utilidad del Fibroscan® para evaluar la fibrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.01.178>

- Chan, J. M., Zhang, L., Yuet, K. P., Liao, G., Rhee, J. W., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2009). PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30(8). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.013>
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133(2). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.073>
- Cole, B. K., Feaver, R. E., Wamhoff, B. R., & Dash, A. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(2). <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1410135>
- Cordero-Espinoza, L., & Huch, M. (2018). The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(1). <https://doi.org/10.1172/JCI93562>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Desmoulibre, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., & Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta Induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 122(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, N. (2019). Tgf- $\beta$  in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Díaz, L. A., Arab, J. P., Louvet, A., Bataller, R., & Arrese, M. (2023). The intersection between alcohol-related liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20(12). <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00822-y>
- Dolai, J., Mandal, K., & Jana, N. R. (2021). Nanoparticle Size Effects in biomedical applications. *ACS Applied Nano Materials*, 4(7). <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c00987>
- Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P.N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103(2). <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcp158>
- Duan, Y., Pan, X., Luo, J., Xiao, X., Li, J., Bestman, P. L., & Luo, M. (2022). Association of inflammatory cytokines with non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880298>
- Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. Springer. <https://doi.org/10.1007/b136495>
- El-Maadawy, W. H., Hammam, O. A., Seif el-Din, S. H., & El-Lakkany, N. M. (2020).  $\alpha$ -Lipoic acid modulates liver fibrosis: A cross talk between TGF- $\beta$ 1, autophagy, and apoptosis. *Human and Experimental Toxicology*, 39(4). <https://doi.org/10.1177/0960327119891212>

- Fang, R. H., Aryal, S., Hu, C. M. J., & Zhang, L. (2010). Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir*, 26(22). <https://doi.org/10.1021/la103576a>
- Feltrin, F. da S., Agner, T., Sayer, C., & Lona, L. M. F. (2022). Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. *Advances in Colloid and Interface Science*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102582>
- Foo, N. P., Lin, S. H., Lee, Y. H., Wu, M. J., & Wang, Y. J. (2011).  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- $\beta$ . *Toxicology*, 282(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.009>
- García-Topete, D. A., Álvarez-Lee, L. A., Carballo-López, G. I., Uriostegui-Campos, M. A., Guzmán-Uribe, C., & Castro-Ceseña, A. B. (2024). Antifibrotic activity of carbon quantum dots in a human in vitro model of non-alcoholic steatohepatitis using hepatic stellate cells. *Biomaterials Science*, 12. <https://doi.org/10.1039/d3bm01710a>
- Gautheron, J., Gores, G. J., & Rodrigues, C. M. P. (2020). Lytic cell death in metabolic liver disease. *Journal of Hepatology*, 73(2). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.001>
- Ghitman, J., Biru, E. I., Stan, R., & Iovu, H. (2020). Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. In *Materials and Design*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108805>
- Hammerich, L., & Tacke, F. (2023). Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 20(10). <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00807-x>
- Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2). <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>
- Huby, T., & Gautier, E. L. (2022). Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nature Reviews Immunology*, 22(7). <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00639-3>
- Jazayeri-Tehrani, S. A., Rezayat, S. M., Mansouri, S., Qorbani, M., Alavian, S. M., Daneshi-Maskooni, M., & Hosseinzadeh-Attar, M. J. (2019). Nano-curcumin improves glucose indices, lipids, inflammation, and Nesfatin in overweight and obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *Nutrition and Metabolism*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0331-1>
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., & Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6). <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Krenkel, O., Hundertmark, J., Ritz, T. P., Weiskirchen, R., & Tacke, F. (2019). Single cell RNA sequencing identifies subsets of hepatic stellate cells and myofibroblasts in liver fibrosis. *Cells*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cells8050503>

- Liu, G., Liu, J., Pian, L., Gui, S., & Lu, B. (2019).  $\alpha$ -lipoic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis through the suppression of the TGF- $\beta$ /Smad3 pathway and autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 19(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9719>
- Liu, X., Xu, J., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2013). Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts. *Current Pathobiology Reports*, 1(3). <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0018-7>
- Longhitano, L., Distefano, A., Musso, N., Bonacci, P., Orlando, L., Giallongo, S., Tibullo, D., Denaro, S., Lazzarino, G., Ferrigno, J., Nicolosi, A., Alanazi, A. M., Salomone, F., Tropea, E., Barbagallo, I. A., Bramanti, V., Li Volti, G., Lazzarino, G., Torella, D., & Amorini, A. M. (2024). (+)-Lipoic acid reduces mitochondrial unfolded protein response and attenuates oxidative stress and aging in an in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Translational Medicine*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-024-04880-x>
- Luo, J., & Shen, S. (2020). Lipoic acid alleviates schistosomiasis-induced liver fibrosis by upregulating Drp1 phosphorylation. *Acta Tropica*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105449>
- Ma, Q., Li, Y., Fan, Y., Zhao, L., Wei, H., Ji, C., & Zhang, J. (2015). Molecular mechanisms of lipoic acid protection against aflatoxin b1-induced liver oxidative damage and inflammatory responses in broilers. *Toxins*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/toxins7124879>
- Marchesini, G., Day, C. P., Dufour, J. F., Canbay, A., Nobili, V., Ratziu, V., Tilg, H., Roden, M., Gastaldelli, A., Yki-Jarvinen, H., Schick, F., Vettor, R., Fruhbeck, G., & Mathus-Vliegen, L. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 64(6). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
- Mardinoglu, A., Boren, J., Smith, U., Uhlen, M., & Nielsen, J. (2018). Systems biology in hepatology: Approaches and applications. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(6). <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0007-8>
- Mcmurry, J. (2008). *Química Orgánica*. (7<sup>a</sup> ed., pp. 419-430). Cengage learning. [https://www.academia.edu/38246455/Quimica\\_Organica\\_7ma\\_Edicion\\_John\\_McMurry](https://www.academia.edu/38246455/Quimica_Organica_7ma_Edicion_John_McMurry)
- Meier, R. P. H., Meyer, J., Montanari, E., Lacotte, S., Balaphas, A., Muller, Y. D., Clément, S., Negro, F., Toso, C., Morel, P., & Buhler, L. H. (2019). Interleukin-1 receptor antagonist modulates liver inflammation and fibrosis in mice in a model-dependent Manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061295>
- Min, A. K., Kim, M. K., Seo, H. Y., Kim, H. S., Jang, B. K., Hwang, J. S., Choi, H. S., Lee, K. U., Park, K. G., & Lee, I. K. (2010). Alpha-lipoic acid inhibits hepatic PAI-1 expression and fibrosis by inhibiting the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.050>
- Moghtadaie, A., Mahboobi, H., Fatemizadeh, S., & Kamal, M. A. (2023). Emerging role of nanotechnology in treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *EXCLI Journal*, 22. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6420>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Nicolete, R., Santos, D. F., & Faccioli, L. H. (2011). The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *International Immunopharmacology*, 11(10). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.014>
- O'Neill, H. S., Herron, C. C., Hastings, C. L., Deckers, R., Lopez-Noriega, A., Kelly, H. M., Hennink, W. E., McDonnell, C. O., O'Brien, F. J., Ruiz-Hernández, E., & Duffy, G. P. (2017). A stimuli responsive liposome loaded hydrogel provides flexible on-demand release of therapeutic agents. *Acta Biomaterialia*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.001>
- Park, J. K., Utsumi, T., Seo, Y. E., Deng, Y., Satoh, A., Saltzman, W. M., & Iwakiri, Y. (2016). Cellular distribution of injected PLGA-nanoparticles in the liver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(5). <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.013>
- Ploeger, D. T., Hosper, N. A., Schipper, M., Koerts, J. A., Rond, S., & Bank, R. A. (2013). Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Communication and Signaling*, 11(29). <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-29>
- Prouenchep, S. W. (1979). Inverse Problems in Polymer Characterization: Direct Analysis of Polydispersity with Photon Correlation Spectroscopy. *Die Makromol. Chem*, 180(1). <https://doi.org/10.1002/macp.1979.021800119>
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12). <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2018). Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. En Tekade, R. (ed). *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 369–400). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>
- Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratziu, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M. F., Anstee, Q. M., Arab, J. P., Arrese, M., Bataller, R., Beuers, U., Boursier, J., Bugianesi, E., Byrne, C. D., Castro Narro, G. E., Chowdhury, A., Cortez-Pinto, H.,... Newsome, P. N. (2023a). A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*, 78(6). <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000520>
- Rinella, M. E., Neuschwander-Tetri, B. A., Siddiqui, M. S., Abdelmalek, M. F., Caldwell, S., Barb, D., Kleiner, D. E., & Loomba, R. (2023b). AASLD Practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 77(5). <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000323>
- Sanyal, A. J. (2019). Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(6). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0144-8>
- Silva, P. C. D., Portela, A. S., Lima, R. S. C., Santana, C. P., Medeiros, A. C. D., & Da Silva Simões, M. O. (2016). Compatibility study between lipoic acid with polymers used in controlled drug release systems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(2). <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4850-3>



- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- ThermoFisher. (s.f.). *FTIR sample techniques: attenuated total reflection (ATR)*. Recuperado el 12 de marzo de 2024 de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fourier-transform-infrared-spectroscopy/resources/ftir-spectroscopy-academy.html#sampling-techniques>
- Tibullo, D., Li Volti, G., Giallongo, C., Grasso, S., Tomassoni, D., Anfuso, C. D., Lupo, G., Amenta, F., Avola, R., & Bramanti, V. (2017). Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflammation Research* 66(11). <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1079-6>
- Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Varghese, S. E., Fariya, M. K., Rajawat, G. S., Steiniger, F., Fahr, A., & Nagarsenker, M. S. (2016). Lecithin and PLGA-based self-assembled nanocomposite, Lecithmer: preparation, characterization, and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 6. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0314-y>
- Wan, S., Zhang, L., Quan, Y., & Wei, K. (2018). Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: Enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*, 5. <https://doi.org/10.1098/rsos.181457>
- Weng, H., Mertens, P. R., Gressner, A. M., & Dooley, S. (2007). IFN- $\gamma$  abrogates profibrogenic TGF- $\beta$  signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *Journal of Hepatology*, 46(2). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.09.014>
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R. J., & Friedman, S. L. (1994). Induction of  $\beta$ -platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4). <https://doi.org/10.1172/JCI117497>
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1). <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- Zarybnicky, T., Matouskova, P., Ambroz, M., Subrt, Z., Skalova, L., & Bousova, I. (2019). The selection and validation of reference genes of mRNA and microRNA expression studies in human liver slices using RT-qPCR. *Genes*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/genes10100763>
- Zhang, S., & Wang, C. (2023). Effect of stirring speed on particle dispersion in silica synthesis. *Nano-Structures and Nano-Objects*, 35. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2023.100994>
- Zheng, D., Jiang, Y., Qu, C., Yuan, H., Hu, k., He., L., Chen, P., Li, J., Tu, M., Lin, L., Chen, H., Lin, Z., Lin, Z., Lin, W., Fan, J., Cheng, G., & Hong, J. (2020). Pyruvate kinase M2 tetramerization protects against hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 190(11). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.08.002>